

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



**ESTUDIO DE MUTANTES AFECTADOS EN LA REGULACIÓN DE
LA EXPRESIÓN DE HLA-DP Y EN LA PRESENTACIÓN DE
ANTÍGENO MEDIADO POR ESTE LOCUS**

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor en
Biología por:

Alberto M. Álvarez Barrientos

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'A. Álvarez', is written to the right of the author's name.

Directores: Prof. Dr. Miguel Sánchez Pérez
Prof. Dr. César Nombela Cano

A large, stylized handwritten signature in dark ink, likely belonging to Miguel Sánchez Pérez, is written over the name.

MADRID 1995

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'C. Nombela', is written to the right of the director's name.

**CÉSAR NOMBELA CANO, CATEDRÁTICO-DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II DE LA FACULTAD DE
FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

CERTIFICA: Que D. **Alberto Álvarez Barrientos** ha realizado en el Dpto. de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de los Catedráticos D. Miguel Sánchez Pérez y D. César Nombela Cano, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor en Biología con el título: **ESTUDIO DE MUTANTES AFECTADOS EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HLA-DP Y EN LA PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO MEDIADO POR ESTE LOCUS.**

Y para que conste, firmo la presente certificación en Madrid a 25 de Mayo de 1995

Fdo. Prof. Dr. D. César Nombela Cano

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'César Nombela', with a long horizontal stroke extending to the right.

A MI PADRE
IN MEMORIAM

AGRADECIMIENTOS

Quiero dejar constancia de mi agradecimiento a todas las personas que han ayudado de alguna forma a la realización de este trabajo. Especialmente quiero mencionar a:

Los Dres. D. César Nombela y D. Miguel Sánchez que me “aceptaron” en circunstancias difíciles y que han dirigido este trabajo, permitiéndome desarrollar el proyecto en el Dpto. de Microbiología II.

Al Dr. Carlos Fdez-Ardavín Castro, por ser el tutor y ponente de este trabajo.

A los Dres. R. DeMars, S. Shaw y J. Gorski, por cedernos amablemente algunos de los anticuerpos y líneas celulares utilizados en este trabajo.

A los componentes históricos del cuarto 13 del Dpto. de Biología Celular de la Fac. de Biología (Alfonso, Alberto, Nines, M^a Jesús, Ana, Javier, Constantino,...), quiero agradecerles su apoyo en los malos momentos y, por encima de todo, su amistad, tal vez inmerecida. Tampoco quisiera olvidarme de M^a José, Lucre y Alfonso.

A todos los miembros del Dpto. de Microbiología II de la Facultad de Farmacia, por su compañía, fundamentalmente a Benito, José Peña, Isabel, Victor, Javi, Rosa, Rosi, Rosita, Humberto, y a todos los que se me olvidan.

Especialmente, quiero agradecer toda su ayuda, apoyo y comprensión a los componentes de la unidad 6: Inma, Enma, Melba, que siempre estará con nosotros, y a Mayte por su criticismo constructivo y por todo el tiempo que ha invertido en la realización de esta memoria.

A Antonia, Mada, Miguelín, Alejandra, Amalia, Rafa, M^a Yuste por haberme distinguido con su amistad y por todo el apoyo y ayuda que me han ofrecido.

A los que no están físicamente, pero siempre lo están en nuestro pensamiento, Jesús de la Fuente, Melba, Esperanza, Alfonso, ...

A los miembros del Depto. de Bioquímica y Biología Molecular III de la Fac. De Farmacia, por su ayuda en determinados apartados de este trabajo y por su sincera amistad.

A los usuarios del Centro de Citometría de Flujo de la UCM, por su comprensión.

A mi familia que siempre me ha apoyado y sustentado, en especial a mi madre, impulso constante de trabajo y cariño, y a M^a Jesús en la distancia siempre presente.

ABREVIATURAS

aa	: aminoácido
Ac	: anticuerpo
Ag	: antígeno
AcM	: anticuerpo monoclonal
ANA	: anticuerpo antinuclear circulante
ASO	: oligonucleótido específico de alelo
BCIP	: sal toluidínica de 5-bromo-3-cloro-3-indolilfosfato
CD	: Enfermedad Celiaca
CDF	: citometría de flujo
CLIP	: péptido de la cadena invariable asociado a clase II
CPA	: célula presentadora de antígeno
CTLs	: linfocitos T citotóxicos
DIG	: digoxigenina-11-dUTP
DMSO	: dimetilsulfóxido
EDTA	: ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	: cuantificación de la unión de anticuerpo mediante reacción enzimática colorimétrica
EtBr	: bromuro de etidio
FITC	: isotiocianato de fluoresceína
GAM-FITC	: anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína
GAM-PE	: anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con ficoeritrina
HLA	: Complejo Principal de Histocompatibilidad Humano
IDDM	: Diabetes Mellitus Dependiente de Insulina
Ig	: inmunoglobulina
Ii	: cadena invariable
IP	: yoduro de propidio
JRA	: Artritis Reumatoide Juvenil
Kb	: kilobase
Kd	: kilodalton

LCL	: línea celular linfoblastoide
mcc	: medio de cultivo completo
MHC	: Complejo Principal de Histocompatibilidad
min	: minuto
MLR o PLTs	: cultivo mixto de linfocitos
ORF	: <i>marco abierto de lectura</i>
pb	: pares de bases
PBLs	: células mononucleares de sangre periférica
PBS	: tampón fosfato salino
PCR	: reacción en cadena de la polimerasa
PCR-SSOs	: reacción en cadena de la polimerasa e hibridación con oligonucleótidos específicos de secuencia
PE	: ficoeritrina
RA	: Artritis Reumatoide
RE	: retículo endoplásmico
RER	: retículo endoplásmico rugoso
RF	: factor reumatoide
RFLP	: polimorfismo de los fragmentos de restricción
RIA	: radioinmunoanálisis
rpm	: revoluciones por minuto
seg	: segundo
SSO	: oligonucleótido específico de secuencia
STF	: suero de ternera fetal
T ^a	: temperatura
TAE	: Tris-EDTA
TCR	: receptor de la célula T
TMAC	: cloruro de tetrametil amonio
TNG	: red de sáculos de la zona trans del Aparato de Golgi
UV	: ultravioleta

NOMENCLATURA

1. Especificidades de HLA-DP: DPw2, DPw4, etc.
2. Alelos de HLA-DP correspondientes a estas especificidades: DPA1*0103 (DPa) y DPB1*02012 (DPβ), de la especificidad DPw2; DPA1*01 (DPa) y DPB1*0401 (DPβ), de la especificidad DPw4.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD	2
1.2 EL SISTEMA DE HISTOCOMPATIBILIDAD HUMANO	2
1.3 MOLÉCULAS DE CLASE I	5
1.4 MOLÉCULAS DE CLASE II	9
1.4.1 CADENA INVARIABLE	13
1.5 GENES Y POLIMORFISMO DE LA REGIÓN HLA-D	16
1.5.1 LOCUS HLA-DR	17
1.5.2 LOCUS HLA-DQ	18
1.5.3 LOCUS HLA-DP	18
1.5.4 HLA-DNA Y -DOB	19
1.5.5 HLA-DMA Y-DMB	20
1.6 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CLASE II EN LINFOCITOS B	22
1.6.1 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y POST-TRANSCRIPCIONAL DEL MHC DE CLASE II	24
1.6.2 SECUENCIAS REGULADORAS DE LOS GENES DE LAS MOLÉCULAS DE CLASE II	25
1.6.3 PROTEÍNAS QUE SE UNEN A LOS PROMOTORES DE LOS GENES DE CLASE II	30
1.6.4 ESTUDIO DE FUSIONES CELULARES	35
1.7 PAPEL DE LAS MOLÉCULAS DE CLASE I Y CLASE II EN LA PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO	37
1.7.1 PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO POR MOLÉCULAS DE CLASE I	37
1.7.2 PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO POR MOLÉCULAS DE CLASE II	41
II. OBJETIVOS	48

III. MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.1 MATERIALES	52
3.1.1 PRODUCTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS	52
3.1.2 MATERIAL PLÁSTICO	52
3.1.3 EQUIPO INSTRUMENTAL	52
3.2 MÉTODOS	54
3.2.1 CULTIVOS CELULARES	54
3.2.2 ANTICUERPOS MONOCLONALES	55
3.2.3 FUSIONES DE CÉLULAS SOMÁTICAS	56
3.2.4 ESTUDIO DE INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA Y CITOMETRÍA DE FLUJO	57
3.2.5 MICROSCOPIA CONFOCAL	59
3.2.6 MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CLASE II POR CITOQUINAS	59
3.2.7 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	59
IV. ANTECEDENTES	73
V. RESULTADOS	79
5.1 EXPRESIÓN DE RNAm Y SU CUANTIFICACIÓN MEDIANTE DENSITOMETRÍA	80
5.2 EFECTO DEL IFN- γ Y DE LA IL-4, SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLASE II DE LAS LÍNEAS CELULARES MUTANTES	85
5.3 PRODUCCIÓN DE HÍBRIDOS SOMÁTICOS	87
5.4 MUTANTES QUE RECUPERAN LA EXPRESIÓN DE HLA-DP	91
5.5 MUTANTES QUE NO RECUPERAN LA EXPRESIÓN DE HLA-DP	94
5.6 CLONACIÓN DE LOS PROMOTORES DE DPA1*0103 Y DPB1*02012	95
5.7 MUTANTES POST-TRANSCRIPCIONALES	97
VI. DISCUSIÓN	106
6.1 REGULACIÓN CONJUNTA O INDIVIDUALIZADA DE LOS GENES DE CLASE II DEL MHC	107
6.2 MUTANTES CON ALTERACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE HLA-DP	109
VII. CONCLUSIONES	120
VIII. BIBLIOGRAFÍA	123

I. INTRODUCCIÓN

1. EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) fue definido por Gorer y Snell en 193', trabajando con distintas cepas de ratón, como un conjunto de genes cuyos productos eran responsables del rechazo de injertos entre individuos de la misma especie genéticamente distintos. Está constituido por un grupo de genes estáeicamente relacionados que codifican varios tipos de proteínas, las cuales desempeñan un papel fundamental en la generación y regulación de la respuestá inmune (Benacerraf, 1981). También se encuentran dentro del MHC genes no relacionados, al menos aparentemente, con el Sistema Inmunitario (Spies y cols., 1989). Se ha demástrado la existencia del MHC en todos los vertebrados superiores analizados (Danska y McDevitt, 1987) y ha sido exhaustivamente estádiado en el ratón: sistema H-2 (Carlson, 1987) y en el hombre: sistema HLA (Dausset, 1981).

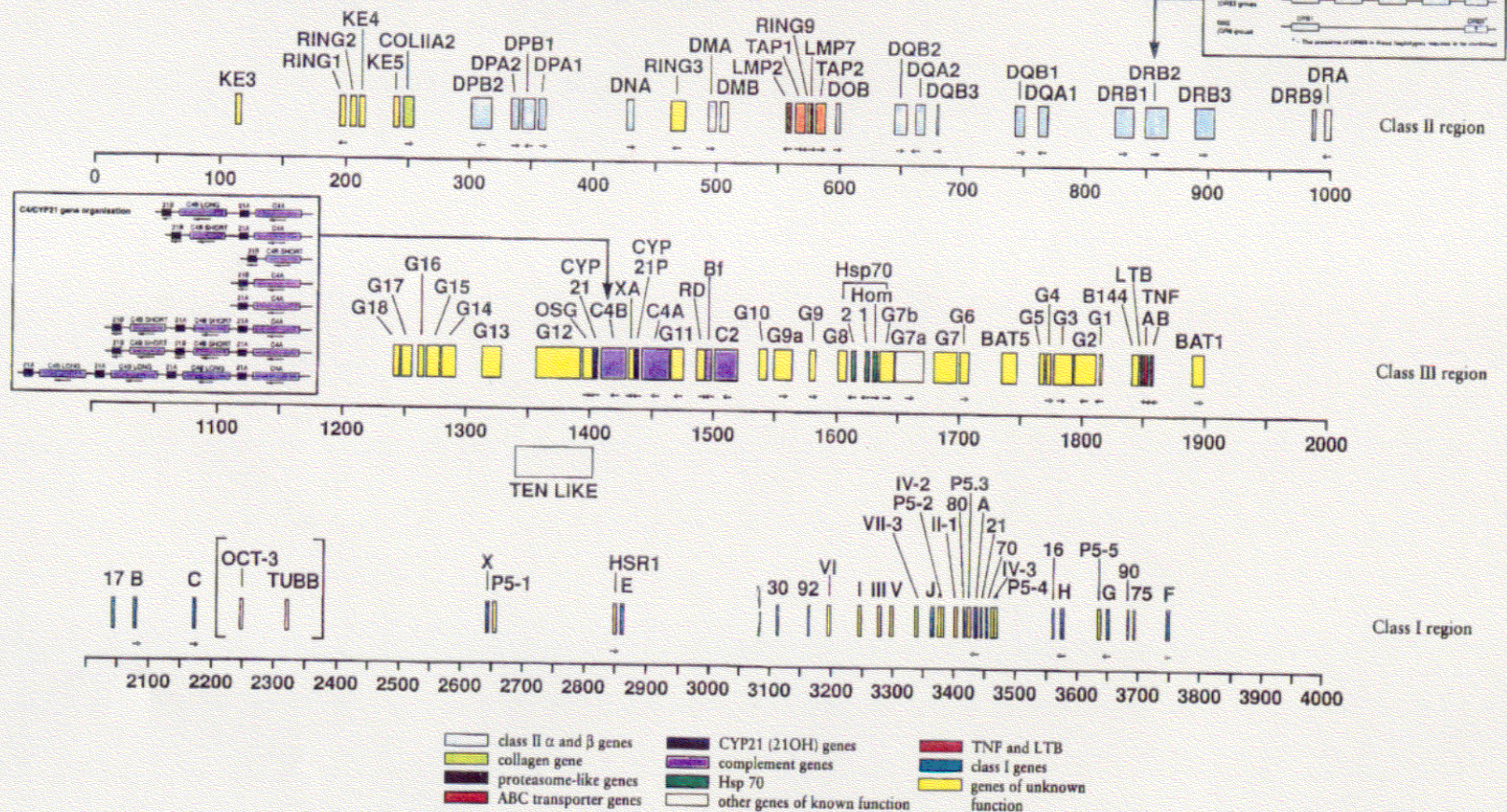
2. EL SISTEMA DE HISTOCOMPATIBILIDAD HUMANO

Los genes que pertenecen al Complejo Principal de Histocompatibilidad Humano o HLA, están localizados en el brazo corto del cromósoma 6, expandiéndose a lo largo de aproximadamente 3'00 kb (Dunham y cols., 1987). Los genes que forman parte de está complejo, se han clasificado en tres grupos teniendo en cuenta las características estructurales y funcionales de los productos que codifican, denominándose clase I, clase II y clase III (Steinmetz y Hood, 1983'. Los dos primeros muestráan un elevado polimorfismo y se extienden a lo largo de 1600 Kb en el extremo telomérico y 900 kb en el extremo centromérico, respectivamente, del cromósoma 6. Entre los genes de clase I y clase II, se localiza la región de clase III a lo largo de 100 kb, cuyos genes son moderadamente polimórficos (Ziegler y cols., 1989). En la figura 1 se presenta el mapa detallado del complejo con la localización, orientación y distancia relativa entre los genes que lo integran (Campbell y Trowsdale, 1993'.

La región más centromérica, también conocida como HLA-D, corresponde a los genes de clase II, como ya se ha mencionado. Incluye los loci HLA-DP, DQ y DR, que codifican para las moléculas del másmo nombre (Trowsdale y cols., 1985'. Estás moléculas se expresan en

FIGURA 1. Mapa físico del HLA (Campbell y Trowsdale, 1993'

Mapa del Complejo Principal de Histocompatibilidad humano (HLA)



The exact locations of OCT-3 and TUBB have not yet been established.

linfocitos B, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células epiteliales y linfocitos T activados. En linfocitos B, células dendríticas y células epiteliales del timo, la expresión de estas moléculas es constitutiva; para el resto de las células, la expresión es inducible por diferentes citoquinas. Además de los genes clásicos de la región HLA-D, varios *loci* han sido localizados en esta misma zona, dos de ellos son HLA-DMA (Trowsdale y Kelly, 1985' y DOB (Tonelle y cols., 1985', si bien aún no han sido identificados sus productos génicos.

Entre DMA y DOB, se encuentran los genes DMA y DMB (Kelly y cols., 1991a), de limitado polimorfismo respecto a los genes de los otros *loci* de dicha región (Sanderson y cols., 1994). Se postula que estas genes tienen un papel importante en la generación de los complejos péptido-molécula de clase II, aunque se desconoce la función precisa que realizan. Las moléculas codificadas por estas genes, una cadena α y otra β , podrían formar un heterodímero que presentase una cavidad para la unión de un reducido número de péptidos (Fling y cols., 1994). También han sido localizados en esta región dos grupos de genes cuya función es la de suministrar péptidos a las moléculas de clase I (DeMars y Spies, 1992). Uno de los grupos está integrado por los genes TAP1 y TAP2, que codifican productos que están relacionados con el transporte de péptidos al interior del retículo endoplásmico dependiente de ATP. El segundo grupo está constituido por los genes LMP2 y LMP7 que parecen estar involucrados en el procesamiento de antígenos de clase I.

La región de clase III, situada en posición telomérica respecto a la región de clase II, codifica para proteínas funcionalmente relacionadas con el Sistema Inmune, como son los componentes del complemento C2, C4A, C4B y factor B (Carrol y cols., 1984); genes de la 21-hidroxilasa, 21A y 21B; factor de necrosis tumoral (TNF α y TNF β) (Carrol y cols., 1987), proteínas de choque térmico como HSP70-1 y HSP70-2 (Sargent y cols., 1989; Milner y Campbell, 1990) y numerosos genes que codifican proteínas de función aún desconocida.

La región de clase I se encuentra en la posición más telomérica del HLA. Los genes de clase I conocidos definen los *loci* HLA-A, B, C, E, F, G, H y X. Los tres primeros codifican los productos de clase I clásicos que se expresan en la mayoría de las células nucleadas de los distintos tejidos del organismo, aunque el nivel de expresión varía entre los diferentes tejidos. Los antígenos HLA-E, F, G, H y X presentan un patrón de expresión más

restingido y no están bien caracterizados desde el punto de vista funcional (Shimizu y cols., 1988; Orr, 1989; Wei y Orr, 1990). Once pseudogenes han sido identificados en esta región (Koller y cols., 1989).

3. MOLÉCULAS DE CLASE I

Las moléculas de clase I están constituidas por dos cadenas polipeptídicas, una pesada de peso molecular aproximado de 44 kd y una ligera, denominada β 2-microglobulina, de 12 kd (Kimbal y Coligan, 1983), que no está codificada por los genes del MHC (Goodfellow y cols., 1975). La cadena pesada consta de tres dominios extracelulares denominados α 1, α 2 y α 3' (Ploegh y cols., 1981). Cada dominio extracelular está compuesto por aproximadamente 90 aminoácidos. En la posición Asn-86 del dominio α 1 existe una unidad de carbohidrato unida a través de enlace N-glicosídico (Barbosa y cols., 1987). Los dominios α 2 y α 3' presentan puentes disulfuro intracatenarios. El dominio α 3' está seguido de un segmento de aproximadamente 25 aminoácidos hidrofóbicos que forman la zona de transmembrana. A continuación se sitúa una cola citoplásmica integrada por unos 3' aminoácidos. La molécula β 2-microglobulina, con un puente disulfuro en su estructura, se encuentra asociada con la porción extracelular de la cadena pesada (figura 2A). Los dominios α 1 y α 2 de la cadena pesada son muy polimórficos, contrastando con el dominio α 3' y con la cadena β 2-microglobulina, que están muy conservados. Estos dos dominios conservados, presentan una gran semejanza con las regiones constantes de las inmunoglobulinas (Bjorkman y Parham, 1990).

La estructura de los genes de clase I refleja la organización en dominios de la proteína (figura 3). En el extremo 5', después de la región que incluye las secuencias promotoras, se sitúan los exones más variables (1, 2 y 3) que codifican para el péptido señal y para los dominios α 1 y α 2 respectivamente. El resto de los exones situados hacia el extremo 3', codifican para el dominio de transmembrana, la cola citoplásmica y el extremo 3' no traducido (Strachan, 1987; Pontarotti y cols., 1989).

La cristalización de la porción extracelular de la molécula HLA-A2 (Bjorkman y cols., 1987a, b) y posteriormente de HLA-Aw68 (Garret y cols., 1989) ha supuesto un avance fundamental para el conocimiento de la relación estructura-función en estas proteínas. En la figura 4 se presenta la estructura de HLA-A2. Los dominios α 1 y α 2 se disponen en la zona

FIGURA 2. Estructura de las moléculas de clase I (A) y de clase II (B) (Owen, 1991).

FIGURA 3. Esquema de la estructura exón-intrón de los genes HLA de clase I y de clase II, con los dominios para los que codifican cada uno de los exones.

más alejada de la membrana, formando una cavidad de 25 Å de larga, 10 Å de ancha y 11 Å de profundidad. Esta cavidad constituye el sitio de unión de los péptidos producidos por el procesamiento antigénico. Los lados de la cavidad están formados por las regiones de α -hélice de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, mientras que la base la forman las láminas β de ambos dominios. Los extremos de dicha cavidad están cerrados por interacciones entre los aminoácidos de las hélices α y aquellos situados en posiciones más extremas de las cadenas β . Los residuos de la lámina β , así como los de las hélices α orientados hacia el interior de la cavidad, son ligandos hipotéticos para los péptidos antigénicos, mientras que los residuos de las hélices α orientados hacia la parte superior se unirían al receptor de la célula T (TCR). En estas zonas es donde se concentra la mayor parte del polimorfismo de las moléculas de clase I (Bjorkman y cols., 1987b).

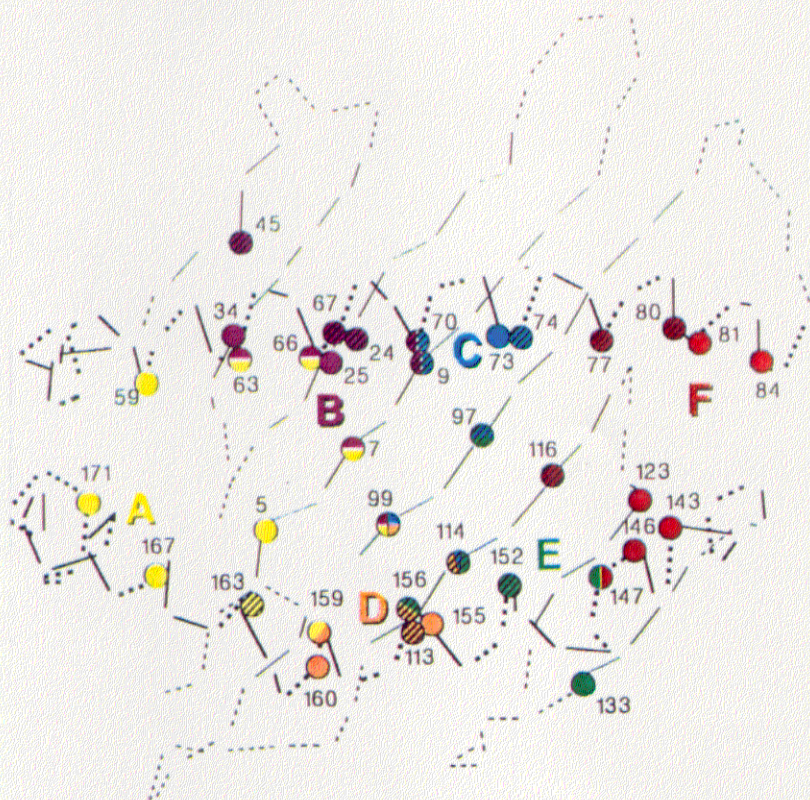
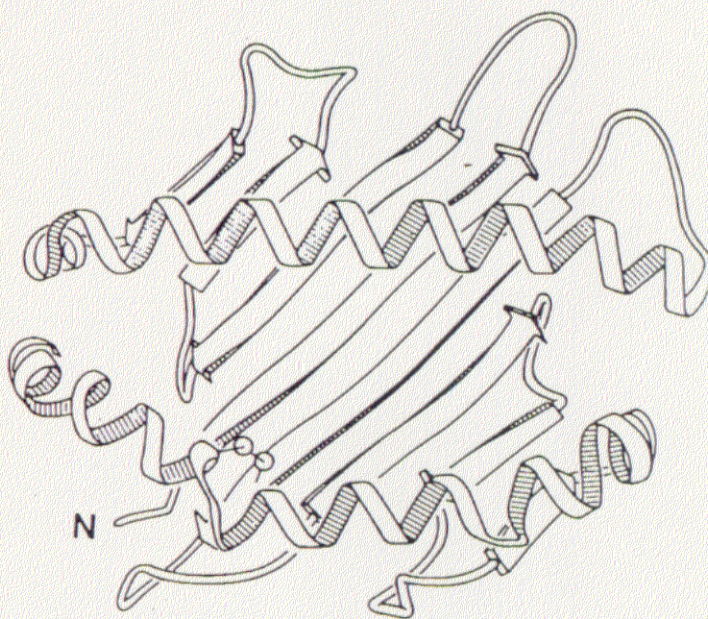
El papel del péptido es fundamental en la estabilización de la molécula de clase I. Estudios de secuenciación de los péptidos naturales unidos a las moléculas de clase II revelan que la longitud de los mismos es normalmente de 9 aminoácidos (Rötzschke y cols., 1990; Van Bleek y Nathanson, 1990; Falk y cols., 1991; Hunt y cols., 1992a), aunque el tamaño varía entre 8 y 11 (Falk y cols., 1991; Jardeztky, 1991; Cho, 1992). Estudios cristalográficos de varias proteínas de clase I, tanto humanas como de ratón, han permitido identificar un mecanismo común para la unión del péptido a dichas proteínas. Péptidos de diferentes secuencias se unen de forma similar, con los extremos N y C terminales secuestrados por una red de enlaces de hidrógeno a los residuos conservados de las proteínas de clase I (Madden y cols., 1992) (figura 7A). Péptidos de diferente longitud, 8-11 residuos, se acomodan formando un bucle en la parte media (Zhang y cols., 1992; Fremont y cols., 1992; Madden y cols., 1993; Young y cols., 1994). Saper y cols. en 1991, identificaron una serie de cavidades que se extendían a lo largo del sitio de unión al péptido; se trata de seis cavidades conocidas como A, B, C, D, E y F (figura 5). Dichas invaginaciones, son diferentes para los distintos alelos de las moléculas de clase I y complementarios de las características comunes que presenta cada grupo de péptidos que se une a un alelo concreto. Estos datos sugieren que las restricciones impuestas por la arquitectura de las depresiones varía entre los alelos de clase I y juega un papel importante en la selección de los péptidos (Carreno

FIGURA 4. A) Representación de la estructura tridimensional de la molécula de clase I HLA-A2, con los dominios polimórficos $\alpha 1$ y $\alpha 2$ orientados hacia el exterior, y el dominio $\alpha 3$ y la $\beta 2$ -microglobulina orientados hacia la membrana celular. B) Representación esquemática de la molécula vista desde la parte superior (Bjorkman y cols., 1987a).

FIGURA 5. Representación de las seis cavidades (A, B, C, D, E y F) presentes en el sitio de unión al péptido de la molécula de clase I (Hansen y cols., 1993).



B



y cols., 1990; Falk y cols., 1991; Matsumura y cols., 1992; Guo y cols., 1993'.

La función principal de las moléculas de clase I es la de presentar péptidos antigénicos procedentes de proteínas sintetizadas por la célula o que se encuentran en el citosol, a los linfocitos T citotóxicos (Townsend y Bodmer, 1989). Mientras que el TCR reconoce residuos polimórficos en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de las moléculas de clase I, las moléculas CD8 reconocen determinantes monomórficos del dominio $\alpha 3$ (Saper y cols., 1991).

4. MOLÉCULAS DE CLASE II

Las moléculas de clase II son heterodímeros formados por dos glicoproteínas transmembranales asociadas de forma no covalente: una cadena α de peso molecular 31-33 kd y una cadena β de peso molecular 26-28 kd (Kauffman y cols., 1984). Ambas cadenas, α y β , están divididas en dos dominios extracelulares de aproximadamente 90 aminoácidos (aa), designados como $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$, $\beta 2$. La cadena α posee dos oligosacáridos unidos a través de enlaces N-glicosídicos, situados uno en cada dominio extracelular, y un enlace disulfuro en el dominio $\alpha 2$. La cadena β posee un carbohidrato unido por enlace glicosídico, en el dominio $\beta 1$, y dos puentes disulfuro, uno en cada porción extracelular (Crompton y cols., 1984; Korman y cols., 1985; Trowsdale y cols., 1985). Ambas cadenas tienen un péptido de conexión de unos 12 aa altamente hidrofílicos, que conecta los dominios extracelulares con la región transmembranal de 20-25'aa y finalmente una cola intracitoplásmica de 8-15'aa (figura 2B). En las moléculas de clase II, el polimorfismo se sitúa en los segmentos $\alpha 1$ y $\beta 1$; los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ están muy conservados.

Como ocurre en los genes de clase I, la organización génica es reflejo de la estructura proteica. Según se muestra en la figura 3' tanto en la cadena α como en la β el primer exón codifica la región 5' no traducida, el péptido señal y los primeros aminoácidos del dominio amino terminal. El resto de dominios extracelulares están codificados en el segundo y tercer exón. La cadena α consta de cinco exones; el péptido de conexión, la región transmembrana, la cola citoplásmica y parte del extremo 3' no traducido están codificados en el cuarto exón. El quinto exón codifica el resto de la región 3' no traducida. Los genes β poseen un total de seis exones. El péptido de conexión, la región transmembrana y parte de la cola citoplásmica están codificadas en el exón 4; otra zona de esta cola

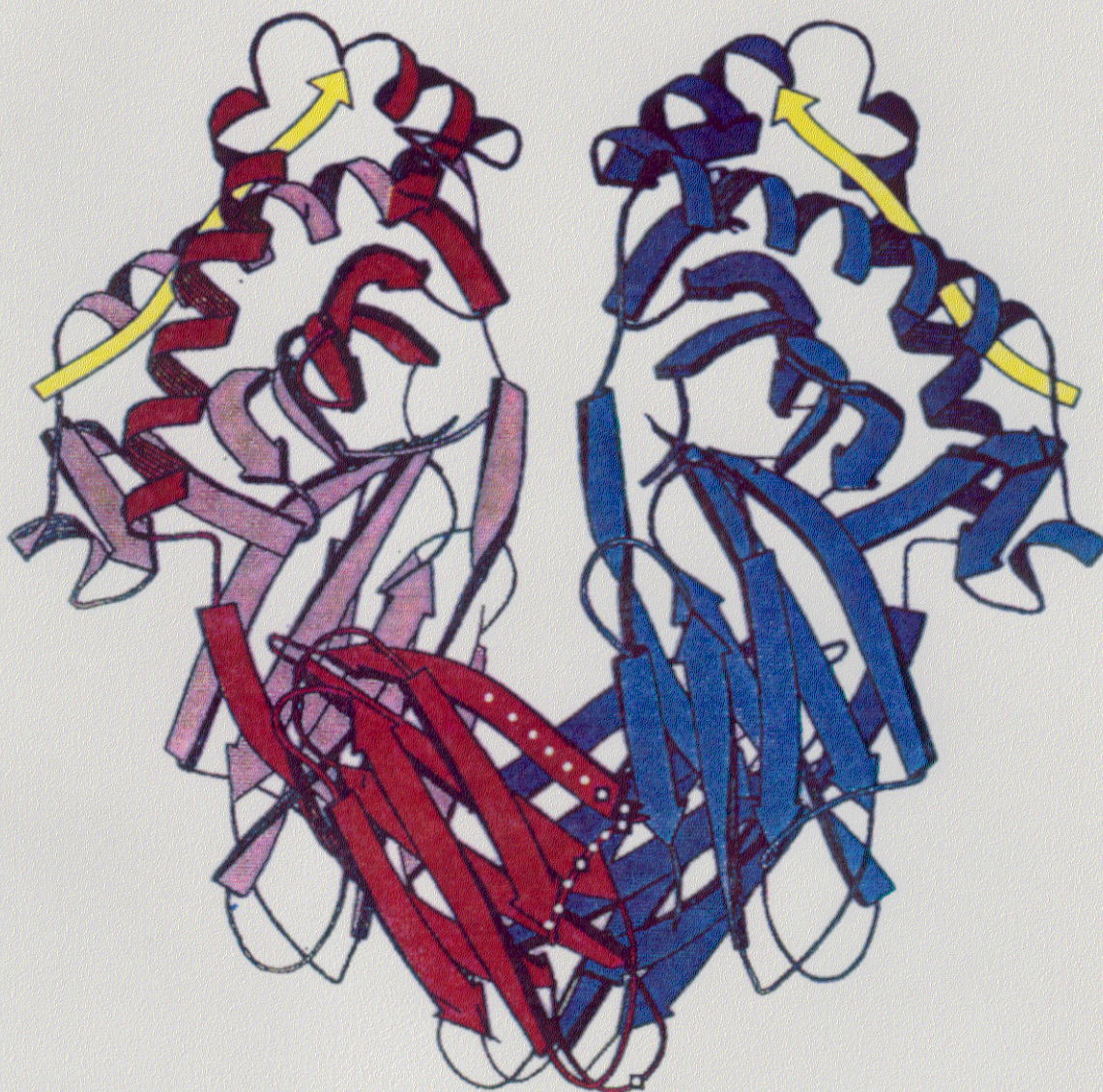
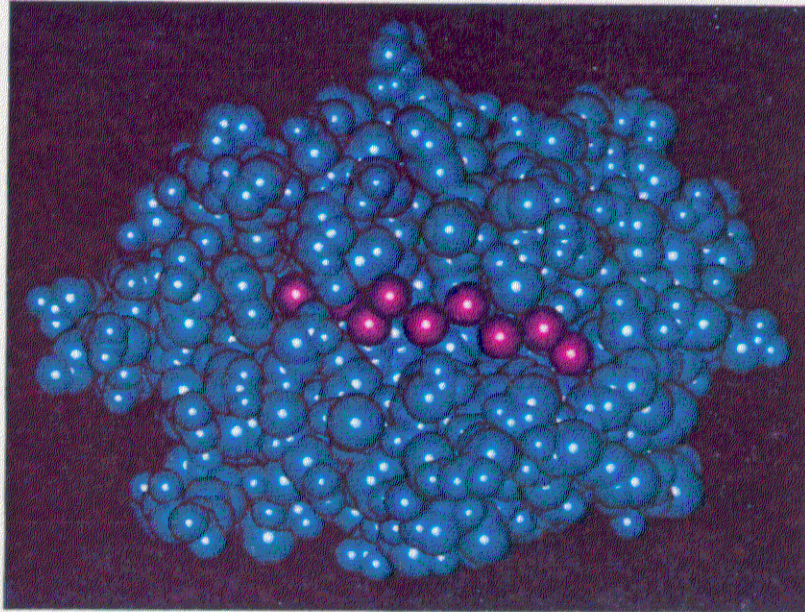


FIGURA 6. Representación de la estructura tridimensional dimérica (dímero de heterodímeros α/β) de la molécula de clase II HLA-DR1. Una molécula DR1 aparece en color rojo, otra en color azul, y el péptido en color amarillo (Brown *et al.*, 1993).

A



B

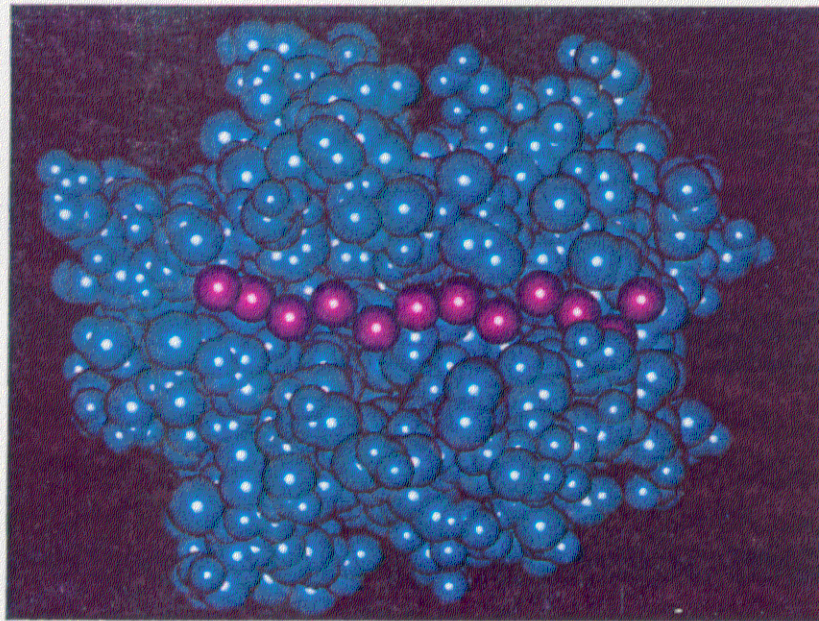


FIGURA 7. A) Unión del péptido a la molécula HLA de clase I.
B) Unión del péptido a la molécula HLA de clase II. (Germain, 1994).

citoplásmica está codificada en el exón 5' mientras que el exón 6 codifica el resto de la cola y la región 3' no traducida. Comparando las secuencias nucleotídicas de los genes de las 5 familias de moléculas de clase II (HLA-DP, HLA-DN, HLA-DM, HLA-DQ y HLA-DR), se observa que los genes que más difieren del resto en cuanto a secuencias, posibles sitios de glicosilación y polimorfismo, son DMA y DMB (Radley y cols., 1994).

Combinando los datos de difracción de rayos X obtenidos a partir de tres preparaciones diferentes de cristales de la molécula de clase II HLA-DR1, Brown y cols., (1993) han determinado la estructura tridimensional de esta molécula (figura 6). Dicha estructura es semejante al modelo hipotético de clase II que fue descrito por Brown y cols. en 1988. Las moléculas HLA de clase I y de clase II presentan estructuras similares en la mayoría de los dominios. Determinados aminoácidos que "cierran" los extremos de la cavidad donde se une el péptido en las moléculas de clase I, no están presentes en las moléculas de clase II, lo que origina un sitio de unión al péptido de "extremos abiertos", que permite que este se una en una conformación extendida a lo largo de la cavidad, proyectando los extremos fuera de la misma (figura 7B) (Brown y cols., 1993). Este hecho concuerda con la longitud de los péptidos purificados de las moléculas de clase II, que varía entre 12-24 aminoácidos (Rudensky y cols., 1991; Hunt y cols., 1992b; Chiczy y cols., 1992; Chiczy y cols., 1993). La distribución de las posiciones conservadas y polimórficas en el sitio de unión al péptido, sugiere que los residuos conservados contactan con los átomos de la cadena principal del péptido, y las cavidades de los residuos polimórficos, lo hacen con las cadenas laterales de los péptidos. Recientemente, Stern y cols. (1994) han cristalizado la molécula HLA-DR1 con un péptido antigénico muy bien caracterizado: HA306-318 (Rothbard y Geffer, 1991) de la hemaglutinina del virus de la influenza, con el objetivo de interpretar con detalle las interacciones que tienen lugar en el sitio de unión al péptido. El péptido HA se une a la cavidad en una conformación extendida con los extremos N y C-terminales proyectados fuera de la misma; por tanto, dichos extremos no parecen ser críticos ni en la unión a la molécula HLA-DR1, ni en la unión a TCR. Los surcos de la molécula de clase II acomodan 5 de 13 cadenas laterales aminoácidas del péptido y, como en clase I, parece existir especificidad de alelos para los

diferentes péptidos. Hay 15 puentes de hidrógeno entre la molécula HLA-DR1 y la cadena principal del péptido HA. En 12 de los 15 enlaces de hidrógeno están implicados átomos conservados de HLA-DR1 en la mayoría de las moléculas de clase II, tanto humanas como de ratón, lo que sugiere un modo común de unión del péptido distinto a la estrategia usada por las moléculas de clase I (Brown y cols., 1993).

4.1 CADENA INVARIABLE

Junto a las cadenas α y β codificadas por genes del MHC, se une de forma transitoria otra molécula conocida como cadena invariable y que no está codificada por ningún gen del MHC. La cadena invariable es una glicoproteína de transmembrana no polimórfica de tipo II, es decir, con el extremo $-NH_2$ situado en el citoplasma y el extremo $-COOH$ situado en el lumen del retículo endoplásmico (RE). Fue descrita inicialmente por Jones y cols., en 1978, y su gen se localiza en el cromósoma 5. En el RE, la cadena invariable (Ii) parece formar un homotrímero (Roche y cols., 1991). Este trímero se une a tres dímeros α/β , formando un multímero de 9 cadenas. Está proceso de ensamblaje parece estar mediado por interacciones transitorias con chaperoninas (Cresswell, 1994). La asociación de la cadena invariable con las moléculas de clase II en el RE, aunque no es imprescindible para el ensamblaje y expresión del dímero en la superficie de la célula (Sekaly y cols., 1988), sí favorece la eficiencia del proceso (Claesson y Peterson, 1985). En ausencia de la Ii la expresión en superficie del dímero α/β es muy baja.

Sin embargo, en está caso, se han detectado acúmulos de moléculas de clase II en el RE mediante tinciones intracitoplásmicas (Lamb y cols., 1991; Peterson y Miller, 1990; Viville y cols., 1993). Estas moléculas están asociadas con chaperoninas en el RE durante largo tiempo, debido a la ausencia de la cadena invariable, y pueden representar las moléculas que están mal plegadas y ensambladas. La pequeña proporción de moléculas que se expresa en superficie deben corresponderse a una subpoblación que se ensambla bien, o moléculas mal ensambladas que han escapado a la retención de las chaperoninas en el RE (Cresswell, 1994).

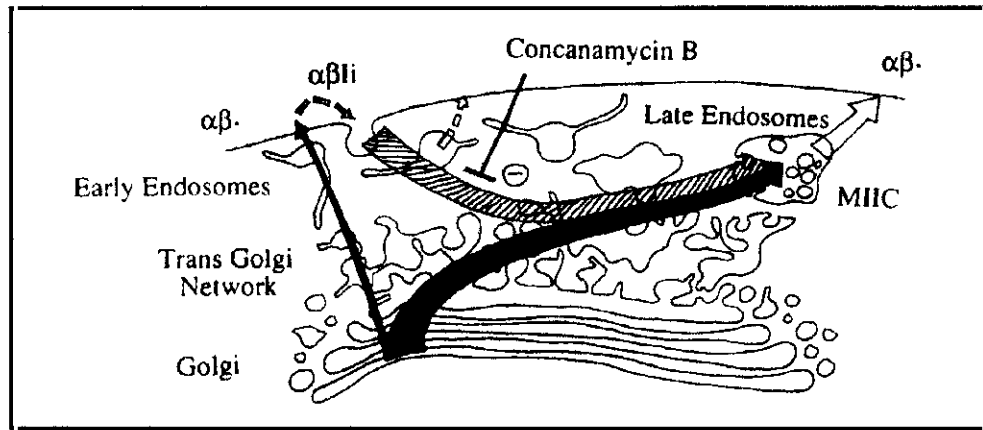
Se ha propuesto un papel crucial para la cadena invariable en la presentación de antígeno por parte de las moléculas de clase II. En primer

lugar, favorece el proceso de dimerización de las cadenas α y β . También dirige las moléculas de clase II a través del Golgi y las embarca en la ruta endocítica donde las moléculas de clase II van a interaccionar con los péptidos internalizados por la célula (Cresswell, 1994). En segundo lugar, inhibe la unión de péptidos a la molécula de clase II en el RE. El análisis de los péptidos obtenidos de la elución de las moléculas de clase II (Rudensky y cols., 1991; Hunt y cols., 1992b; Chiczy y cols., 1992), ha permitido la identificación de un fragmento común de li que incluye los residuos aminoacídicos 85-101, y que es conocido como región CLIP (péptido de la cadena invariable asociado a clase II) (Riberdy y cols., 1992). De aquí se deduce la posibilidad de que esta región se asocie a zonas conservadas del sitio de unión al péptido de la molécula de clase II, lo que imposibilita la unión y presentación de péptidos libres derivados de proteínas citosólicas, que son los ligandos para las moléculas de clase I (Riberdy y cols., 1992; Sette y cols., 1992). Esto explicaría que las moléculas de clase II no se asocien a péptidos en el RE, sino en un lugar posterior de la ruta endo-exocítica, favoreciendo así la presentación de antígeno exógeno y no endógeno. Esta hipótesis es apoyada por experimentos realizados en fibroblastos de rata, que no expresan li, transfectados con HLA-DR. En este sistema se han detectado moléculas de clase II en RE que forman dímeros estables resistentes a la acción del SDS, por lo tanto, unidas a péptido (Hitzcl y cols., 1995). En tercer lugar, se han identificado importantes secuencias de aminoácidos características, en la región citoplásmica de la molécula, posiblemente implicadas en la retención de la misma en el RE, así como otras secuencias distintas, localizadas en la misma región, y que son responsables del transporte de las moléculas de clase II hacia los endosomas (Lotteau y cols., 1990).

Según estudios de Peters y cols. (1991), las moléculas de clase II se separan de la vía normal hacia la superficie celular en la red de retículos trans-Golgi (TGN). La mayoría de los complejos $\alpha\beta$ li son dirigidos desde la TGN hacia el compartimento donde interaccionan con los péptidos (MIIC, de compartimento de clase II), sin pasar por la superficie celular ni por los endosomas tempranos en ruta hacia la vía endocítica (Bénaroch y cols., 1994), aunque siempre existe una pequeña proporción de complejos que puede ir directamente a superficie o pasar por los endosomas tempranos. El tratamiento con concanamicina B, que inhibe la endocitosis, aumenta la expresión de los complejos $\alpha\beta$ li en la superficie celular. La forma y el camino

mediante el que las moléculas de clase II aparecen en superficie no se conoce. Podría ser que directamente desde los MIIC se dirigiesen a la superficie (Bénaroch y cols., 1994) (Figura 8), o que desde estos compartimentos, una vez separados de la li y asociadas al péptido, volviesen al TGN, y desde allí siguiesen la vía constitutiva de exocitosis hacia la

FIGURA 8.- Vía propuesta por Bénaroch y cols., (1994) para el tránsito de las moléculas de clase II desde el TGN hasta la superficie celular. La explicación en el texto.



superficie (Cresswell, 1994).

Sadegh-Nasseri y Germain (1991) han demostrado que el péptido juega un papel importante en la estabilización de la estructura de las moléculas de clase II, tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, en contraste con las moléculas de clase I, los dímeros α/β de clase II pueden asociarse en ausencia de péptido, como lo demuestran la expresión de moléculas vacías en la superficie (Stern y Wiley, 1992).

La función fundamental de los antígenos de clase II, es la de presentar péptidos antígenicos de proteínas exógenas que son internalizadas y procesadas por las células presentadoras de antígeno (CPA), a los linfocitos T cooperadores (Neefjes y cols., 1993). Mediante estudios de mutagénesis dirigida, se han identificado algunos residuos del complejo HLA-DR1/péptido que pueden interaccionar con el TCR, y que estarían situados en la parte del péptido alejada del lugar de unión a la molécula de clase II y en la región de hélice α de la cadena β de HLA-DR1 que forma la parte más sobresaliente de la estructura. La molécula de adhesión de la célula T, CD4, parece unirse al dominio $\beta 2$ de DR1, según se

ha observado por estádios de mutagénesis en residuos de dicho dominio, que alteran la afinidad por CD4.

Se han descubierto dímeros de la molécula DR1 en los cristales analizados (figura 6); dos observaciones sugieren que dichos dímeros desempeñan un papel fisiológico. La primera observación es que las dos moléculas de DR1 que constituyen el dímero, se sitúan paralelamente, con los cuatro extremos C-terminales situados en una misma dirección y los dos sitios de unión al péptido orientados en dirección contraria, como es de esperar para glicoproteínas que se localizan en la superficie de la célula. La segunda observación es que las dos cavidades de unión al péptido están orientadas de tal forma que dos moléculas del tamaño del receptor de la célula T puedan contactar con estas sitios de unión simultáneamente. Por tanto, la formación de estos dímeros puede ser parte integrante de un mecanismo para iniciar señales citoplásmicas en el proceso de activación de las células T. También se sugiere que estos dímeros aumentan la afinidad por la molécula CD4 (Brown y cols., 1993).

Las diferencias estructurales de las moléculas de clase I y de clase II puede ser explicada por su diferente papel en la presentación de antígeno. Las moléculas de clase II unen el péptido en los compartimentos endosomales o lisosomales en los cuales tienen lugar los procesos proteolíticos. Su capacidad para unir péptidos de mayor longitud que se extienden fuera de los extremos de la cavidad de unión, permite que el proceso proteolítico del antígeno pueda ocurrir mientras se está uniendo a la molécula MHC. Por el contrario, las moléculas de clase I unen el péptido en el retículo endoplásmico y unen péptidos más cortos gracias a la evolución conjunta con la maquinaria proteolítica que genera péptidos en el citoplasma (Stern y cols., 1994).

5. GENES Y POLIMORFISMO DE LA REGIÓN HLA-D

Las moléculas de clase II manifiestan un gran polimorfismo alélico. Como ya se ha mencionado, la mayoría de las regiones polimórficas se concentran en los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$. El polimorfismo entre las moléculas de clase II ha sido determinado por diferentes técnicas: mediante serología, definiendo así inicialmente los productos de los locus HLA-DR y HLA-DQ; mediante tipaje celular por cultivo mixto de linfocitos (MLR o PLTs), así se definieron las 6 especificidades iniciales de HLA-DP (Shaw y cols., 1980);

digestión de DNA genómico con enzimas de restricción, seguido de hibridación con sondas específicas del *locus* de clase II correspondiente (RFLP) (Bodmer y cols., 1987); amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del exón 2 de los genes HLA-D, seguido de hibridación con oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO) o específicos de alelo (ASO); amplificación del exón 2 de dichos genes mediante PCR y su posterior secuenciación (Bugawan y cols., 1988). Recientemente se ha creado una base de datos a partir de todas las secuencias conocidas de los genes HLA de clase II, que permite la asignación de alelos a los genes polimórficos analizados. Con los datos de secuencia obtenidos previa amplificación por PCR del segundo exón de un gen HLA-D, se pueden designar alelos mediante comparación de las posiciones polimórficas de la secuencia determinada, con todas las secuencias alélicas conocidas que se encuentran en la citada base de datos (Versluis y cols., 1993; Rozemuller y cols., 1993). El empleo de anticuerpos monoclonales anti-HLA dirigidos frente a los determinantes polimórficos de estos antígenos de histocompatibilidad, constituye también una herramienta muy útil en el análisis del polimorfismo de HLA (Pistillo y cols., 1992).

5.1. Locus HLA-DR

La organización genómica de HLA-DR, ha sido examinada mediante el empleo de cósmidos solapantes (Rollini y cols., 1985). Contiene un solo gen α y un número variable de genes β dependiendo del haplotipo. Así, se expresa un gen α (DRA) y uno o dos genes β (DRB), los restantes genes DRB son pseudogenes. Todos los haplotipos, excepto HLA-DR1 y HLA-DR8, expresan dos productos DRB. El gen DRB1 codifica una cadena β muy polimórfica que puede determinar las especificidades serológicas HLA-DR1 a HLA-DR18. El segundo gen DRB (DRB3, DRB4 o DRB5), codifica una cadena β menos polimórfica que puede determinar las especificidades DR51, DR52 o DR53.

Por tanto, todo el polimorfismo que presenta la molécula HLA-DR, es debido a la cadena β ; la cadena α es muy poco variable. Comparando los productos alélicos de DRB1, este polimorfismo se muestra en varias regiones a lo largo de la molécula: aa 9-13, aa 25-28 y aa 67-74 (Johnson y cols., 1991; Hansen y cols., 1993). Hasta ahora han sido identificados 60

productos alélicos del gen DRB1. Productos de los genes DRB3, DRB4 o DRB5 manifiestan menor polimorfismo; se han identificado cuatro productos alélicos DRB3 y DRB5 (Marsh y Bodmer, 1993).

5.2. Locus HLA-DQ

La subregión HLA-DQ contiene dos genes α (DQA1, DQA2) y tres β (DQB1, DQB2, DQB3) (Campbell y Trowsdale, 1993). Los genes DQA1 y DQB1 codifican el heterodímero HLA-DQ que determina las especificidades serológicas DQ1 a DQ9. Los otros genes son pseudogenes.

Ambas cadenas α y β de HLA-DQ presentan polimorfismo. Entre los productos alélicos de DQA1, las posiciones de variabilidad se disponen a lo largo del dominio $\alpha 1$. Entre los productos alélicos de DQB1, se han identificado tres regiones de variabilidad que comprenden los aminoácidos 26-37, 52-57 y 70-74. Se han identificado 14 alelos DQA1 y 19 DQB1 (Marsh y Bodmer, 1993). En este caso, la diversidad se ve incrementada por la presencia de moléculas HLA-DQ generadas por asociación en *trans* de las cadenas α y β , como ocurre en el dímero DQ2, que confiere susceptibilidad a la enfermedad celiaca, y en el que las mismas cadenas α y β que son codificadas en *cis* en el haplotipo DR3 (DQA1*0501, DQB1*0201), pueden ser codificadas en *trans* en los haplotipos DR5, que contribuye con la cadena α (DQA1*0501) y DR7, que contribuye con la cadena β (DQB1*0201) (Solliid y cols., 1989; Nepom y Erlich, 1991) (figura 9).

5.3. Locus HLA-DP

La subregión HLA-DP contiene dos genes α (DPA1, DPA2) y dos genes β (DPB1, DPB2). Los genes DPA1 y DPB1 codifican el heterodímero HLA-DP que determina las especificidades celulares HLA-DPw1 a HLA-DPw6. DPA2 y DPB2 son pseudogenes. Todos estos genes se localizan en el siguiente orden: DPA1, DPB1, DPA2, DPB2 y fueron encontrados en 11 cósmidos solapantes que cubren un total de aproximadamente 100 kb (Okada y cols., 1985b; Serenius y cols., 1985; Gorski y cols., 1984).

Una de las características fundamentales de esta región es la diferencia en cuanto a la orientación de estos genes, 5'-5' (cabeza a cabeza)

que contrasta con la orientación 3'-3' del resto de los genes de clase II (Okada y cols., 1985a).

El polimorfismo de la región HLA-DP reside fundamentalmente en la cadena β . Dicho polimorfismo fue definido inicialmente con tipaje celular mediante ensayos de medida de la respuesta secundaria proliferativa de células T (PLTs) frente a moléculas DP alogénicas (Shaw y cols., 1980). De esta forma se definieron seis especificidades distintas (DPw1-DPw6) (Shaw y cols., 1980; Robins y cols., 1985). El análisis del polimorfismo de HLA-DP mediante serología ha sido muy difícil debido a la falta de este tipo de reactivos, quizás por la poca inmunogenicidad de esta molécula. Diferentes técnicas como RFLP (Bodmer y cols., 1987) y la identificación de nuevos alelos mediante PCR y su posterior secuenciación, han demostrado que el grado de polimorfismo en HLA-DP es mucho mayor que el revelado inicialmente por PLTs. De esta forma se han definido hasta 8 alelos de DPA1 y 38 de DPB1 (Marsh y Bodmer, 1993). Como se puede apreciar en la figura 9, el polimorfismo del dominio β 1 de HLA-DP β se localiza fundamentalmente en cinco regiones, cada una de las cuales está formada por 1 a 4 aminoácidos. Estas regiones incluyen los aminoácidos 8-11, 35-36, 55-57, 65-69 y 84-88 (Bugawan y cols., 1988). Algunos de estos aa (8-11, 35-36) se localizan en la lámina β (en el fondo de la cavidad de unión al péptido), mientras que el resto se localizan en la estructura de α -hélice de la cadena β . Como ya se ha comentado, el polimorfismo de DP α es mucho más limitado. A diferencia de DP β , no existe una agrupación de las posiciones polimórficas en el dominio α 1 de DP α como la descrita anteriormente en el dominio β 1 de DP β .

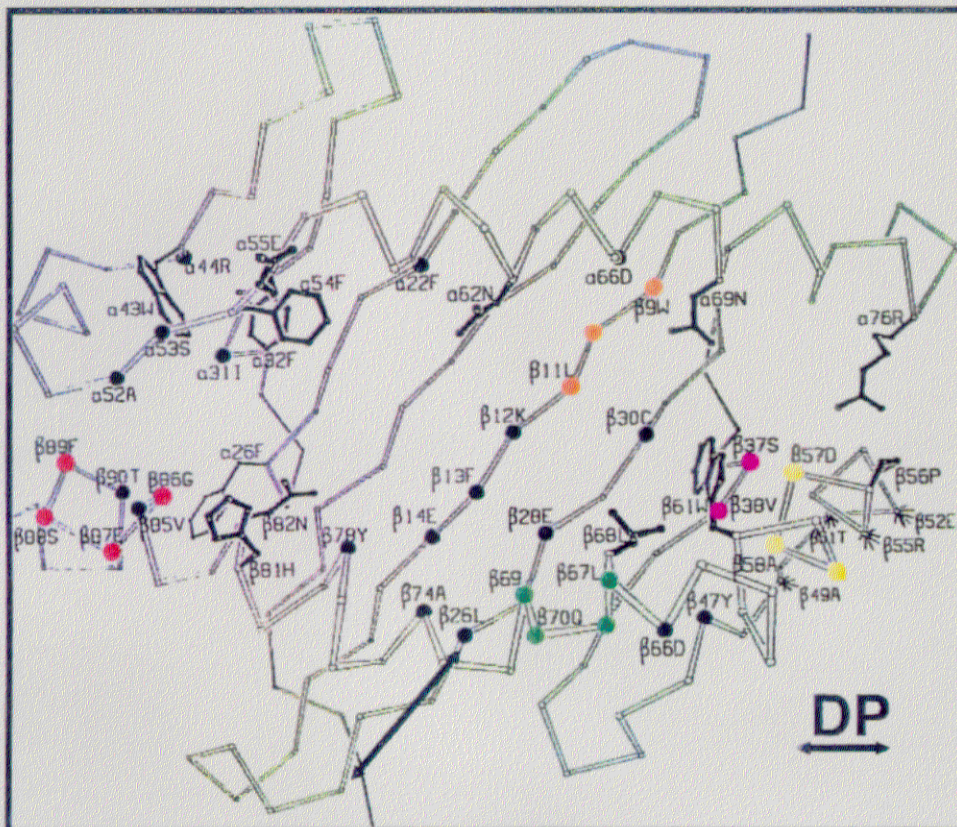
5.4. HLA-DNA y -DOB

Estos genes son muy diferentes de los otros de clase II. Ambos producen RNAm, si bien los patrones de expresión son algo diferentes (Long y cols., 1989). No se han podido identificar y caracterizar los polipéptidos codificados por estos genes, a pesar de que no contienen errores que puedan impedir su expresión. No son polimórficos, no se conoce que formen heterodímeros, ni que participen en presentación de antígeno (Radley y cols., 1994).

5.5. HLA-DMA y -DMB

Estás genes recientemente identificados (Kelly y cols., 1991a), codifican una cadena α (DMA) y otra β (DMB), significativamente diferentes de las otras secuencias de genes de clase II, pero muy conservadas entre el hombre y el ratón (Cho y cols., 1991). La homología de los aminoácidos de DMA y DMB con los genes α y β , respectivamente, tanto de clase I como de clase II, concuerda con la hipótesis de que los productos de DMA y de DMB aparecen como heterodímeros, con un papel importante en la presentación de antígeno (Fling y cols., 1994). Sanderson y cols. (1994), han observado *un bajo nivel de polimorfismo en ambas cadenas, lo que implicaría un papel especializado del heterodímero formado en la unión de péptidos.*

FIGURA 9. Localización de las posiciones polimórficas (aa 8-11, 35-36, 55-57, 65-69 y 84-88) de la molécula HLA-DP β en el modelo propuesto por Brown y cols. (1993). La flecha marrón de doble dirección indica la pérdida de dos aa a partir de la posición 23 en el caso de la molécula de DP, respecto a la molécula de DR.



6.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CLASE II EN LINFOCITOS B

Las moléculas de clase II no se expresan de la misma forma que las de clase I. Sólo determinados tipos celulares del sistema inmune, como ya ha sido mencionado anteriormente, la expresan constitutivamente, aunque se puede inducir su expresión en otros tipos celulares. Ya que la expresión de los genes de las cadenas α y β de clase II está determinado por el linaje celular e influido por el estado de diferenciación y los estímulos externos, los mecanismos por los que se regulan deben ser complejos y, por lo tanto, las proteínas reguladoras que interaccionan con estos genes y determinan su tasa de transcripción deben ser numerosas (Sugawara y cols., 1994).

El nivel de expresión de las moléculas de clase II no es constante en estas células, sino que puede aumentar o disminuir en función de un gran número de estímulos externos. De hecho, hay muchas células de origen epitelial o mesenquimático al igual que algunas células tumorales humanas, que pueden ser inducidas a expresar moléculas de clase II por tratamiento con IFN- γ . Las células que expresan moléculas de clase II pueden ser divididas en dos grupos principales en base a la respuesta de sus genes de clase II frente a estímulos externos:

- Las que lo expresan constitutivamente, como los linfocitos B, que constituyen la principal población de células que expresan cantidades substanciales de moléculas de clase II de manera constitutiva junto con las células dendríticas. Para los linfocitos B, la citoquina IL-4 derivada de los TH2 es el principal estímulo fisiológico inductor de la expresión de clase II durante la diferenciación, y una vez maduro el linfocito B es el más potente activador de la misma.
- Y las que lo expresan dependiendo del estado de activación y de las citoquinas con las que contacten. El segundo grupo está formado por los macrófagos y las células de estirpes no hematopoyéticas. La citoquina IFN- γ derivada de los TH1 es el principal inductor fisiológico de este grupo.

Inductores de clase II en linfocitos B	Represores de clase II en linfocitos B
IL-4 IL-10 Anticuerpos hacia antígenos de diferenciación en superficie (α IgM, α IgD, α Lyb2, α B220) Oncogen H-ras LPS PMA Toxina colérica Virus del papiloma bovino Complejos antígeno-IgE	Prostaglandina E ₂ LPS IFN- γ Dexametasona

Los linfocitos B maduros expresan moléculas de clase II constitutivamente, aunque se ha observado una considerable heterogeneidad en el nivel de expresión en las diferentes subpoblaciones, lo cual puede reflejar diferencias funcionales entre estos grupos. En las células plasmáticas se pierde la expresión de clase II, debido a un mecanismo supresor dominante, como lo demuestran las fusiones entre linfomas B y plasmacitomas, que producen la pérdida de la expresión de las moléculas de clase II (Venkitaraman y cols., 1987; Latron y cols., 1988; Dellabona y cols., 1989).

Sin embargo, la expresión de las moléculas de clase II en las células B puede ser modulada, tanto positiva como negativamente, por estímulos externos. El principal estimulador de la expresión de las moléculas de clase II en los linfocitos B es la citoquina IL-4, que puede aumentar el nivel de moléculas de clase II en células B inactivas 10-15 veces.

Esta inducción es relativamente específica puesto que los niveles de Ig y de moléculas de clase I aumentan sólo ligeramente. La inducción de la expresión de las moléculas de clase II por la IL-4 puede ser reprimida por el IFN- γ (Noelle y cols., 1984; Noelle y cols., 1986; Mond y cols., 1986). También puede ser inducida o activada por la unión de las Ig de superficie a anticuerpos anti-Ig. Esta inducción está acompañada de una despolarización de la membrana y

puede implicar la activación de la proteína kinasa C, puesto que el tratamiento con ésteres de forbol de las células B produce tanto la despolarización de la membrana como el aumento de la expresión de moléculas de clase II (Monroe y cols., 1984). La represión de las moléculas de clase II expresadas constitutivamente por los linfocitos B puede estar mediada por corticosteroides. El tratamiento de linfocitos B de bazo con dexametasona produce una supresión de la expresión de las moléculas de clase II que es dosis dependiente. Esta inhibición puede alcanzar hasta el 70% de la expresión (Dennis y cols., 1986; McMillan y cols., 1988).

En el caso de las células pre-B, la expresión de las moléculas de clase II puede ser inducida por varios estímulos. Como en las células B maduras, la estimulación por IL-4 puede inducir la expresión de moléculas de clase II en células pre-B. Esta inducción puede ser reprimida por prostaglandina E₂. Los anticuerpos contra ciertas moléculas de la superficie celular de células de ratón, como Lyb-2 y B220, pueden estimular la expresión de las proteínas de clase II. Algunas pero no todas las líneas de células pre-B también pueden ser inducidas a expresar clase II por tratamiento con ésteres de forbol. LPS es capaz de aumentar o disminuir los niveles de RNAm de clase II (Monroe y cols., 1983; Turkewitz y cols., 1983; Polla y cols., 1986a; Polla y cols., 1986b; Sarthou y cols., 1987; Polla y cols., 1988; Gravalles y cols., 1989).

6.1 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y POST-TRANSCRIPCIONAL DEL MHC DE CLASE II.

El nivel de expresión de moléculas de clase II en la superficie celular se relaciona estrechamente con el nivel de RNAm de clase II (King y cols., 1983; Chang y Lee, 1986; Fertsch y cols., 1987; Koerner y cols., 1987; Stuart y cols., 1988). Así, la modulación de los niveles de moléculas de clase II en la superficie de la célula está generalmente producida por la regulación de los niveles de RNAm para clase II. La regulación del RNAm puede estar producida por cambios en la velocidad de la transcripción génica o por alteraciones en la estabilidad del RNAm. Existen estudios que proporcionan evidencias de que tanto la expresión de moléculas de clase II, tanto la constitutiva, como la inducida por citoquinas, está regulada a nivel transcripcional.

La velocidad de transcripción del RNAm de DR α , DQ α y DQ β disminuye cuando los núcleos aislados de células B humanas son tratados con cicloheximida, lo cual indica que se necesita una proteína sensible a la cicloheximida para el inicio de la transcripción constitutiva de moléculas de clase II (Maffei y cols., 1989).

La inducción de DR α por IFN- γ en HeLa, en células de melanoma y en fibroblastos de piel ha demostrado producirse a nivel transcripcional. Pero el incremento en los niveles de RNAm excede del aumento en la velocidad de transcripción, por lo que debe estar implicado un mecanismo post-transcripcional (Blonar y cols., 1988; Rosa y cols., 1988; Amaldi y cols., 1989). Otros autores están en contra de un efecto post-transcripcional del IFN- γ y ofrecen la explicación alternativa de que el RNAm de las moléculas de clase II es muy estable (puede alcanzar una vida media de 16-20 horas en transcritos obtenidos en experimentos con IFN- γ), lo cual conduce a un incremento en los niveles de RNAm maduro a pesar de que el aumento en la velocidad de transcripción sea más modesta (Kern y cols., 1989).

6.2 SECUENCIAS REGULADORAS DE LOS GENES DE LAS MOLÉCULAS DE CLASE II.

La regulación transcripcional de la expresión de estos genes ha sido muy estudiada en los últimos años. El análisis de las regiones 5' de estos genes reveló la existencia de varias secuencias consenso. Las moléculas de clase II producen dos efectos interdependientes sobre la especificidad de la respuesta inmune: uno corresponde al polimorfismo alélico del sitio de unión al péptido y el segundo es el resultado del polimorfismo que presentan las regiones promotoras que inducen una expresión variable de los genes de clase II, aunque hasta ahora sólo se ha demostrado para DRB (Louis y cols., 1994).

Muchos elementos reguladores *en cis* han sido identificados para los genes de clase II, a través de fusiones entre secuencias de DNA de clase II y "genes indicadores". Estas construcciones se han transfectado en células cultivadas y determinando cómo se ha expresado el "gen indicador". Se han encontrado elementos reguladores, tanto en las regiones promotoras como en los ORFs. En la figura 10 se describen estas secuencias en HLA-DR α (Sullivan

y cols, 1987). La caja TATA, importante para el inicio de la transcripción, está situada en las posiciones -24 a -28 del sitio de iniciación. A continuación se localiza un octámero (-45 a -52). Entre -74 y -61 se encuentra la caja Y, que contiene una copia invertida de la secuencia CCAAT, un activador transcripcional general. Entre -108 a -95 se encuentra la caja X (Mathis y cols, 1984) y muy cerca (-135 a -117) se encuentra una secuencia muy conservada, la caja Z. Se ha identificado un fragmento de 7-8 pb que se superpone al extremo 3' de la caja X y al extremo 5' de la región intermedia. Este fragmento posee en muchos genes de clase II una homología con elementos reguladores palindrómicos conocidos como elementos de respuesta al cAMP (CREs) y elementos de respuesta al TPA (TREs). Esta región se conoce como X_2 , por lo que la caja X se denomina X_1 . En dirección 5' de los motivos X_1/X_2 existe otra región relativamente bien conservada conocida como **caja S** formada por 7 pb (Benoist y cols., 1990; Liou y cols., 1990; Ivashkiv y cols., 1990).

Existen considerables evidencias experimentales provenientes de transfecciones transitorias de que estos elementos reguladores están involucrados en la regulación tanto de la expresión constitutiva como de la inducible de los genes de clase II.

El análisis más extenso que ha sido realizado de la región promotora de genes humanos de clase II se ha llevado a cabo con genes $DR\alpha$. Los experimentos de deleciones del extremo 5' demostraron que una construcción que se extiende a través del extremo 5' de la caja X se expresa constitutivamente en células B, pero no en células T ni en fibroblastos. La deleción de la caja X reduce marcadamente o anula la expresión de moléculas de clase II en los linfocitos B. La introducción de aproximadamente 30 pb adicionales en dirección 5' de la caja X conduce a un aumento de la expresión constitutiva de moléculas de clase II en células B. Esta región de $DR\alpha$ se ha llamado **caja W** o **Z** y contiene el motivo conservado de la caja S. La expresión mediada por el $IFN-\gamma$ de $DR\alpha$ en células no linfoides requiere construcciones que se extienden a través de la región W para que se produzca una máxima inducción por el $IFN-\gamma$. Las construcciones que sólo incluyen hasta la caja X no consiguieron restablecer la expresión de $DR\alpha$ al ser inducidas por el $IFN-\gamma$.

FIGURA 10.

(Sherman y cols., 1987; Tsang y cols., 1988; Basta y cols., 1988; Stimac y cols., 1991; Cogswell y cols., 1990).

Los análisis de mutaciones de elementos individuales dentro de la región promotora de DR α han permitido esclarecer la contribución de varios de estos elementos a la expresión génica. La mutación de la región W/Z, del sitio X₁ o de la caja Y disminuye la expresión de "genes indicadores" (Tsang y cols., 1990) en células B en más de un 75%. Una segunda caja S, menos conservada, está presente en dirección 3' en la cadena complementaria. La mutación de ambas cajas S disminuye la actividad *cis*, pero no la mutación de una sola (Cogswell y cols., 1991). La mutación de la región entre X₁ y W/Z, denominada **elemento P** porque es rica en pirimidina, también reduce marcadamente la expresión. El elemento W/P no es específico de células B y la función primaria de P puede ser estabilizar los contactos realizados por las proteínas que se unen a la caja X₁ y a la caja W.

Un elemento que regula inhibiendo la expresión de las moléculas de clase II se ha localizado recientemente entre -139 y -179 en dirección 5'. Se le ha denominado elemento V. La mutación del sitio X₂ parece no tener efecto en la expresión de las moléculas de clase II en las células B. No obstante, la naturaleza de estas mutaciones resultan en una conservación parcial del elemento similar a TRE (Tsang y cols., 1990). Las mutaciones puntuales dentro de este sitio que interrumpen completamente el elemento similar a TRE reducen la expresión del gen indicador en células B en más de un 50% (Liou y cols., 1990). La región intermedia entre las cajas X e Y en todos los genes de clase II está conservada en longitud (18-20 pb) pero no en secuencia. Este espacio de dos vueltas de hélice es requerido para la función del promotor de DR α , presumiblemente por alinear los elementos X e Y en el mismo lado de la hélice de DNA. La expresión mediada por IFN- γ en células no linfoides se afecta también severamente por mutación de los elementos W/Z, P, X₁ e Y (Tsang y cols., 1990).

El gen DR α contiene un octámero, único entre los genes de clase II, en dirección 3' de la caja Y. Este elemento fue identificado originalmente en genes de Ig, donde está implicado en la expresión de genes específicos de los linfocitos B. Probablemente el octámero está también involucrado en la mediación de la expresión de DR α , puesto que la mutación de este elemento

reduce marcadamente la expresión constitutiva de DR α en células B pero tiene poco o ningún efecto en la expresión mediada por IFN- γ en células no linfoides (Tsang y cols., 1990; Sherman y cols., 1989).

El promotor de DQ β ha sido analizado de manera similar. En experimentos de expresión transitoria una construcción que contiene los elementos W, X e Y es expresada en células B pero no en células T ni en células no inmunes sin inducir. La delección 5' de la región W reduce ligeramente la expresión de las células B, mientras que la delección 5' de la caja X o la delección 3' de la caja Y da lugar a una gran disminución de la transcripción. Una construcción que contiene las cajas X e Y solamente es expresada en células mutantes como la T5-1 pero no en 6.1.6, mientras que una construcción que contiene sólo la caja Y tiene una expresión muy baja pero detectable en todas las células, sugiriendo que la caja X es la diana fundamental de los factores defectivos en estas líneas celulares (Sakurai y Strominger, 1988; Sloan y Boss, 1988; Stimac y cols., 1991).

La delección de la región W anula la capacidad de inducción del IFN- γ pero conduce a una alta expresión constitutiva, mientras que delecciones a través de X e Y disminuyen esta expresión. Para el gen DP α la región de respuesta al IFN- γ ha sido localizada en una región de 52 pb que contiene las cajas X₁, X₂ e Y y 5 pb en dirección 5'. Esto contrasta con otros promotores de clase II estudiados, todos los cuales requieren una secuencia más en 5' que incluye la zona de la caja W (Yang y cols., 1990).

El examen de varios alelos del gen DQ β ha demostrado cierto polimorfismo, añadiendo un mayor nivel de complejidad a la regulación de la expresión de los genes de clase II.

En resumen, los análisis de varios promotores de genes de clase II humanos y murinos han demostrado que las secuencias conservadas de las cajas X e Y son elementos necesarios para la expresión constitutiva y mediada por las citoquinas IFN- γ y TNF- α . Tanto el sitio X₁ como el X₂ parecen ser funcionales. De hecho, una región en dirección 5' de la caja X también parece estar implicada en el aumento de la expresión constitutiva y es requerida para la expresión inducible. Esta región, que está menos conservada entre los genes de clase II, se ha llamado caja W o Z y contiene un elemento bastante bien conservado que se denomina caja S o H. No se ha definido qué secuencias

dentro de esta región son más importantes para la regulación de la expresión. Además, elementos reguladores adicionales se han identificado sólo en algunos promotores de genes de clase II. Estos incluyen el octámero del promotor del gen DR α que aumenta la expresión en las células B y la caja T del promotor del gen A α que aumenta la inducibilidad mediada por el TNF- α .

6.3 Proteínas Que Se Unen A Los Promotores De Los Genes De Clase II (*trans*)

FACTORES	LUGAR DE UNIÓN
Oct-2	Octámero (DR α)
NF-Ya	Caja Y (CCAAT)
NF-Yb	
YB1	Caja Y
hXBP-1	X ₂ (DR α , DR β)
mXPB	X ₂ (A α)
RF-X	X ₁ (DR α)

Se han identificado varias proteínas que se unen al DNA y que pueden estar implicadas en la regulación de la expresión de los genes de clase II. Los primeros estudios demostraron que los elementos X e Y de clase II son la diana de proteínas que se unen al DNA. Posteriormente, se demostró para la región W/Z/H/S, así como para el octámero presente en DR α (Dorn y cols., 1987; Miwa y cols., 1987; Sherman y cols., 1989a; Tsang y cols., 1990; Dedrick y cols., 1990; Cogswell y cols., 1991).

6.3.1 Proteínas Que Se Unen A La Caja Y

NF-Y:

Fue la primera proteína que se identificó y que se unía a la caja Y del promotor del gen E α de ratón. Reconoce específicamente la secuencia CCAAT dentro de la caja Y, aunque su capacidad de unión está influida por los residuos

que flanquean esta secuencia. También se une a la caja Y de los genes murinos A α , E β y A β .

Esta proteína puede reconocer algunas secuencias CCAAT en genes que no son de clase II, como los de la timidín quinasa o albúmina, sugiriendo que podría jugar un papel más general en la regulación transcripcional y no simplemente regulando la expresión de clase II. Su especificidad de unión la distingue de otras proteínas conocidas que reconocen el motivo CCAAT, como son la CBP y la CTF/NF-1 (Dorn y cols., 1987).

Es un heterodímero formado por dos subunidades: NF-YA y NF-YB, que presenta homología con dos proteínas de levaduras que se unen también a secuencias CCAAT. Esto indica que está conservado filogenéticamente. NF-YA y NF-YB se expresan en todos los tejidos independientemente de si expresan clase II o no (Van Huijsduijnen y cols., 1990). Los anticuerpos monoclonales anti-NF-Y inhiben la transcripción en experimentos de transcripción *in vitro*.

Al parecer, NF-Y puede unirse a dos cajas Y diferentes de clase II, que son idénticas en más de 8 pb de la secuencia consenso de la caja Y pero que difieren en sus secuencias de los flancos (Glimcher & Kara, 1992).

También se han identificado proteínas que se unen a la caja Y de genes de clase II humanos. Una proteína que se une a la caja Y del promotor del gen DR α se denomina YB-1. Esta proteína parece ser un regulador negativo puesto que los niveles de RNAm de YB-1 se correlacionan inversamente con los niveles del RNAm para DR α (Houghton y cols., 1984). YB-1 se une preferentemente a DNA pobre en purinas, requiere la presencia de magnesio y se une a varias secuencias de DNA, incluso en DNA de cadena sencilla (Boss y Strominger, 1986).

Una segunda proteína que se une a la caja Y del promotor del gen DR α se ha denominado YEBP y parece ser el homólogo humano del factor NF-Y murino (Zelevnik-Le y cols., 1991). YEBP puede reconstituir la actividad transcripcional del gen DR α en extracto nucleares que han sido deplecionados de proteínas de unión a la caja Y en un sistema de transcripción *in vitro*.

6.3.2 Proteínas que se unen a la Caja X

Los primeros estudios sobre las proteínas que se unen a la Caja X sugirieron que varios factores nucleares están presentes en los extractos nucleares. Estos factores diferían en su peso molecular (Celada y Maki, 1989) y podían reconocer tanto X_1 como X_2 .

Una proteína humana denominada RFX ha sido clonada debido a su capacidad de interacción con el sitio X_1 de $DR\alpha$ (Reith y cols., 1989). Puede interaccionar como monómero o como homodímero, y sus dominios de dimerización y de unión al DNA son independientes. *In vitro* este factor se une con gran afinidad a los sitios X_1 de $DR\alpha$ y de $DP\alpha$ y con muy poca al de $DQ\alpha$ (Kobr y cols., 1989). Se ha identificado otra proteína humana que se une al sitio X_2 denominándose NF-S (Kobr y cols., 1989). Al contrario que RFX, NF-S muestra mayor afinidad por $DQ\alpha$ que por $DR\alpha$ y $DP\alpha$. Otra proteína que se une al X_2 es hXBP-1. Esta proteína es de la familia de los factores de transcripción de la clase de "cremallera de leucina". Posee un dominio de dimerización de "cremallera de leucina" y una región básica que funciona como dominio de unión al DNA. Esta proteína puede formar un heterodímero con c-Fos pero no con c-Jun (Ono y cols., 1991). Se expresa ubicuamente y se localiza en los cromosomas 5 y 22 (Liou y cols., 1991). La expresión de hXBP-1 leído en la cadena 1 del DNA y produciendo así un RNAm complementario sin sentido (antisense), en transfecciones transitorias en linfocitos B disminuye la expresión de HLA-DR y -DP pero no de -DQ. Existe otra proteína que se une al sitio X_2 de $A\alpha$. Se llama HB16 y tiene, al igual que hXBP-1, un dominio de dimerización en cremallera y un dominio básico de unión a DNA (Ivashkiv y cols., 1990).

Song y cols (1994) han descrito otra proteína que se une a la caja X, denominada NF-X1, que posee una región rica en Cys por donde puede unirse al DNA. La sobre-expresión de esta proteína mediante una construcción con promotor retroviral, disminuye en gran medida la transcripción desde el promotor de $DR\alpha$. Al parecer se activa su expresión después de un tratamiento largo con IFN- γ , pudiendo mediar en la disminución de la expresión de clase II después de su inducción por IFN- γ .

Se han realizado análisis de promotores de HLA-DQ β (Boss y Strominger, 1986) y HLA- $DR\alpha$ (Basta y cols, 1987) mediante delecciones consecutivas. Los elementos que se incluyen hasta -200 son suficientes tanto

para la expresión normal en tejido, como para la inducida por IFN γ . En células inducibles por IFN γ , son suficientes las secuencias que van hasta -136 para una expresión basal, sin embargo la delección hasta -131 (dentro de la caja Z) resulta en una elevada expresión basal y pérdida de la inducibilidad por IFN γ . Delecciones dentro de la caja X producen la pérdida de transcripción. Existen pues tanto elementos reguladores positivos como negativos dentro de estos promotores.

Se han encontrado al menos 4 loci que controlan la transcripción constitutiva de los genes de clase II en los linfocitos B, según se deduce de la existencia de mutantes espontáneos e inducidos *in vitro*. En los mutantes del grupo A, el promotor está ocupado *in vivo*, aunque se encontraron dos importantes diferencias al compararlo, mediante "footprinting", con las células silvestres. Los mutantes del grupo B, tienen la región del promotor desocupada, aunque no "desnuda" como había sido descrito. Así, distintos defectos genéticos resultan en uniones de factores al promotor completamente diferentes.

Se han clonado dos reguladores transcripcionales el RFX-5 y el CIITA, cuyas funciones parecen estar afectadas en los mutantes anteriores. CIITA parece ser el producto del locus AIR-1 (Steimie y cols., 1993, Sartoris y cols., 1994 y Acolla y cols, 1995) y es un activador transcripcional que se une a otras proteínas que se unen al DNA, estabilizando el complejo transcripcional. Se expresa siempre en células clase II+ y no se detecta en células clase II-. Se induce por IFN- γ , lo que implica que puede estar relacionado en la activación de clase II mediada por esta citoquina.

Se ha demostrado (Acolla y cols., 1995) que existe diferente regulación para dos alelos del mismo locus. Es el caso de los alelos DQB1*0301 y *0302, cuya única diferencia en la región del promotor es la ausencia de un dinucleótido TG entre los elementos consenso W y X del alelo *0301. Esta diferencia es suficiente para permitir una mayor transcripción del alelo *0301, debido probablemente al peculiar espacio entre las cajas W y X y a la unión de factores nucleares específicos del dinucleótido TG.

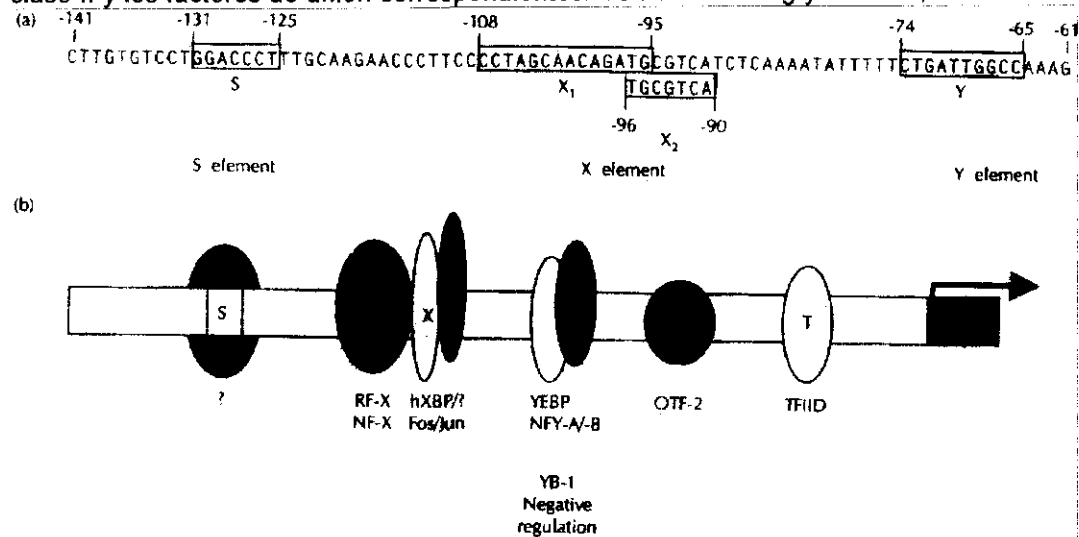
Recientemente, se ha descubierto una nueva secuencia consenso involucrada en la regulación de la expresión de los genes de clase II. Se denomina J y se sitúa cerca de la caja S (Sugawara y cols, 1994). Este grupo ha encontrado una proteína con dominios de unión a DNA tipo "Zn fingers" (dedos

de Zn) que necesita las dos secuencias para unirse al DNA. Por experimentos mediante transfección de secuencias complementarias, se ha visto que es necesaria para la transcripción del gen de la cadena α de DP. El resto de los genes no se veía afectado, por lo que se cree específico de promotor y de cadena.

Se ha llegado a establecer la existencia de regulación de genes de clase II después de la transcripción. La región sin traducir 3' del RNAm de HLA-DR interacciona con, al menos, dos proteínas compartimentalizadas que pueden intervenir en la división del RNAm en el núcleo y en el citoplasma, respectivamente. Transfección de cDNA sin la región 3' sin traducir, produce un RNAm que es liberado preferentemente en el citoplasma, donde se asocia con ribosomas (Acolla y cols, 1995). Por lo tanto, el reconocimiento de señales de retención por parte de determinadas proteínas puede jugar un papel en la distribución del RNAm del MHC y, por tanto, en la cantidad de RNAm de cada isotipo de clase II traducido en cada célula.

El interés en este campo está ahora encaminado a la descripción y clonación de factores que actúan en *trans* uniéndose a las secuencias anteriormente descritas (Acolla y cols, 1991). En la figura 11 se describen algunos de estos elementos y la región del promotor a la cual se unen. Algunos de ellos han sido ya clonados.

FIGURA 11.- Representación esquemática de la región promotora de los genes de clase II y los factores de unión correspondientes. Tomado de Ting y Baldwin, 1993.



6.4 ESTUDIOS DE FUSIONES CELULARES

La fusión de dos líneas distintas de células con diferente expresión de moléculas de clase II y la determinación de la situación de esas moléculas en los híbridos transitorios resultantes se utiliza para estudiar la naturaleza de los factores *trans* implicados en la regulación de la expresión de las moléculas de clase II. Las fusiones entre diferentes líneas de células mutantes clase II⁻ se han utilizado para determinar si existen factores que pueden complementar el defecto de la otra línea celular. Estos estudios han demostrado que existe más de un sólo defecto puede conducir a un fenotipo clase II⁻, porque ciertas fusiones entre dos líneas clase II⁻ conducen a la restauración de la expresión de las moléculas de clase II. Estos análisis de complementación indican que al menos cuatro mutaciones genéticas diferentes son capaces de producir fenotipos clase II⁻, demostrando que hay varios factores *trans* implicados en la regulación de la expresión de estas (Bénichou y Strominger, 1991; Seidl y cols., 1992; Acolla y cols., 1995).

Según Benichou y Strominger (1991), de los experimentos de fusiones somáticas se concluye que al menos, existen 3 grupos de complementación, es decir, estarían afectados 3 factores de regulación en *trans*. Estos factores, tendrían un papel regulador de toda la expresión de clase II, ya que las líneas celulares utilizadas para estos experimentos son MHC clase II⁻. Según Acolla y

cols (1995) serían 4 los grupos de complementación. Mediante fusiones de líneas celulares que provienen de pacientes con inmunodeficiencia asociada a la no expresión de los genes de clase II, Lisowska-Grosspierre y cols. (1994) han llegado a la conclusión de que sólo existen dos grupos de complementación para este tipo de inmunodeficiencia, curiosamente, estos grupos de complementación tienen una característica étnica. La mayoría de los pacientes de uno de los grupos de complementación son de origen Norteafricano y los del otro grupo de complementación son españoles. Esto implicaría a mutaciones recientes que conducen a diferentes tipos de regulación y de expresión de las moléculas de clase II. Así HLA-DP podría estar asociado con enfermedades autoinmunes que se manifiestan más en determinados grupos étnicos (Lisowska-Grosspierre y cols. , 1994).

En el caso de líneas mutantes la forma más rápida de estudiar sus posibles defectos es mediante fusiones con líneas defectivas en los genes de clase II. Si la línea clase II- complementa la mutación, quiere decir que el mutante no tiene afectados los genes de clase II sino algún factor de transcripción. Si no complementa, la alteración puede estar, tanto en el ORF estructural como en las secuencia reguladoras (Glimcher & Kara, 1992; Arroyo y cols, 1994).

7. PAPEL DE LAS MOLÉCULAS DE CLASE I Y CLASE II EN LA PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO

La función principal de las moléculas de clase I y clase II es la de presentar péptidos antigénicos, procedentes de la degradación del Ag, a la célula T (Unanue, 1984; Townsend y Bodmer, 1989). Generalmente las células T citotóxicas (CD8+, CD4-) reconocen péptidos unidos a clase I (Townsend y Bodmer, 1989), mientras que las células T cooperadoras (CD4+CD8-) reconocen péptidos asociados a clase II (Unanue y Allen, 1987).

Existe una especialización de estas moléculas basada en la procedencia del antígeno que procesan. Las moléculas de clase I presentan péptidos generados endógenamente por la CPA, como pueden ser los antígenos víricos (Morrison y cols., 1986). Por otro lado, las moléculas de clase II generalmente presentan péptidos pertenecientes a proteínas extracelulares, como son los procedentes de agentes infecciosos fagocitados por la célula (Unanue y Allen, 1987). Diferencias en las rutas de biosíntesis y tráfico a través de la célula de ambas moléculas son las responsables de esta especialización en la presentación (Germain, 1994; Engelhard, 1994).

7.1. PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO POR MOLÉCULAS DE CLASE I

El requerimiento para que tenga lugar la presentación de antígeno por moléculas de clase I es que el antígeno esté localizado en el citosol y en el lumen del RE (Moore y cols., 1988; Yewdell y cols., 1988). Los péptidos presentados pueden provenir de proteínas sintetizadas endógenamente (bien sintetizadas en el hospedador, bien por el patógeno) que se localizan en el citosol, núcleo o mitocondrias, o de proteínas de procedencia exógena, capaces de atravesar la membrana (Hunt y cols., 1992a).

El péptido se une a la molécula de clase I en el RE y juega un papel fundamental en la estabilidad de la conformación del complejo y en el ensamblaje y transporte de estas moléculas, como ha sido mencionado anteriormente (Ljunggren y cols., 1990; Elliot, 1992). Moléculas de clase I que no unen péptido antigénico son rápidamente degradadas. Esto ha sido

que no unen péptido antigénico son rápidamente degradadas. Esto ha sido comprobado utilizando líneas celulares mutantes, como RMA-S (Townsend y Bodmer, 1989) y 721.174 (DeMars y cols., 1985), que expresan bajos niveles de moléculas de clase I y no son capaces de presentar péptidos de antígenos sintetizados en el citoplasma. Cuando se incuban estas células con péptidos, vuelven a expresar moléculas de clase I en superficie y recuperan la capacidad de presentación, indicando el papel estabilizador del péptido. Una evidencia directa de que el RE es el lugar principal de adquisición del péptido por parte de las moléculas de clase I, proviene del aislamiento de péptidos idénticos, tanto a partir de las moléculas de clase I expresadas en la superficie, como de aquellas todavía confinadas en el RE (Germain, 1993).

Algunos genes que codifican proteínas implicadas en el procesamiento y transporte de los péptidos presentados por las moléculas de clase I, se localizan en la región de clase II del MHC. Los productos de los genes TAP1 y TAP2, se cree que forman un heterodímero situado en las membranas del RE y del cis-Golgi (Kleijmeer y cols., 1992) cuya función es transportar péptidos desde el citosol al RE (Shepherd y cols., 1993; Neefjes y cols., 1993). La expresión de estos genes no es constitutiva en todas las células, aumentando mediante activación por citoquinas. Estas proteínas de transporte muestran especificidad de secuencia y de tamaño; así, péptidos con un tamaño adecuado para la unión a la molécula de clase I, son transportados más eficientemente. El estudio publicado por Powis y cols. (1992), demuestra la existencia de cierto polimorfismo en los transportadores TAP de rata, y recientemente, se ha encontrado otra zona de polimorfismo en el gen TAP2 (Powis y cols., 1993). Mediante la elución de péptidos a partir de moléculas de clase I, se pone de manifiesto que existe relación entre el transportador presente y la población de péptidos presentados.

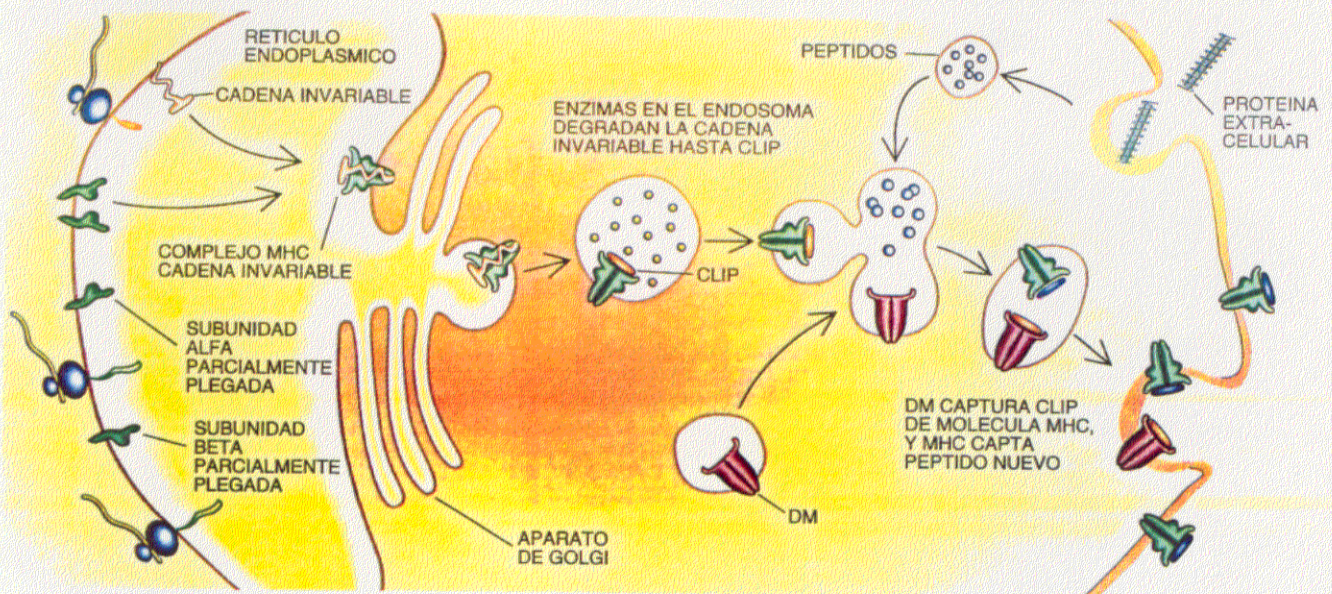
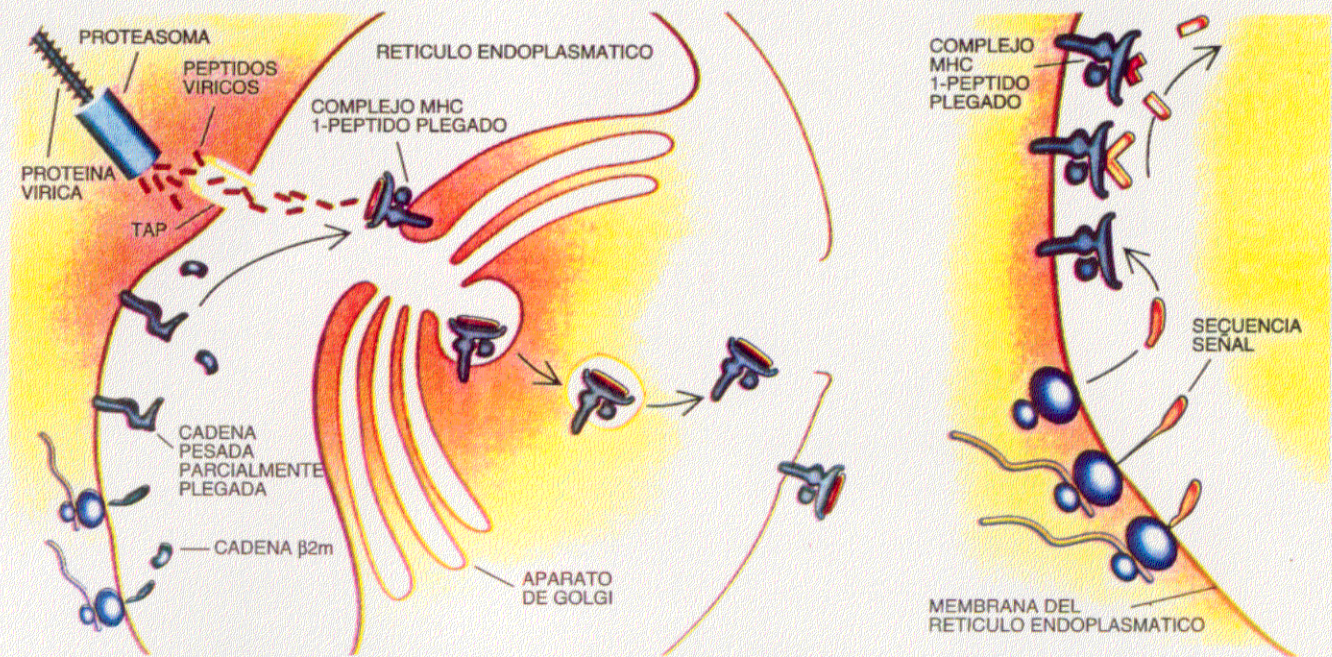
Las proteínas que se encuentran en el citosol, deben ser procesadas a péptidos de menor tamaño que puedan acceder posteriormente al RE. Este procesamiento, se cree que se lleva a cabo por un complejo multicatalítico de proteasas conocido como proteasoma (Martínez y Mónaco, 1991; Glynn y cols., 1991; Kelly y cols., 1991b). El proteasoma está compuesto por 16-20 componentes conservados desde las bacterias a los

vertebrados (Goldberg y Rock, 1992) y que parecen ser responsables en el citosol de la degradación de proteínas previamente unidas a una pequeña molécula llamada ubiquitina (Abbas y cols., 1994). Estas dos subunidades, LMP2 y LMP7, alteran la especificidad de sustrato del proteasoma para la degradación de proteínas, favoreciendo la rotura en residuos adyacentes a aquellos convenientes para la unión en la cavidad F de la molécula de clase I (Driscoll y cols., 1993; Gaczynska y cols., 1993). Células deficientes en la expresión de estas dos subunidades del proteasoma son capaces de procesar el antígeno (Momburg y cols., 1992; Arnold y cols., 1992). Por tanto, la contribución de LMPs en la presentación del péptido a las moléculas de clase I, permanece aún desconocida.

Se ha apuntado también la posibilidad de una degradación de ciertas proteínas en péptidos dentro del RE. Algunos polipéptidos que forman parte del TCR (Lippincott-Schwartz y cols., 1988), moléculas de histocompatibilidad (Koppelman y Creswell, 1990), así como cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (Bole y cols., 1986) son degradadas en este compartimento. Estas cadenas pesadas, en ausencia de cadenas ligeras, son retenidas en el RE por unión a proteínas BIP y posteriormente degradadas (Bole y cols., 1986). Parece claro que los péptidos procedentes de degradación en el citosol representan la mayoría de los péptidos que se unen a clase I en el RE. La degradación de proteínas en el mismo, aunque

FIGURA 12. Procesamiento de antígeno y presentación del mismo por moléculas de clase I, en células presentadoras de antígeno (Engelhard, 1994).

FIGURA 13. Procesamiento de antígeno y presentación del mismo por moléculas de clase II, en células presentadoras de antígeno (Engelhard, 1994).



es evidente su existencia, no parece tener significación funcional desde el punto de vista del procesamiento de antígeno (Brodsky y Guagliardi, 1991).

Tanto la cadena pesada como la β 2-microglobulina de las moléculas de clase I son translocadas al RE. La cadena pesada se asocia con una proteína de dicho compartimento conocida como calnexina o p88 (Degen y Williams, 1991), hasta el ensamblaje completo de la molécula de clase I. En células que no expresan β 2-microglobulina, la cadena pesada permanece asociada a p88 en el RE hasta su degradación, y esto ocurre por la incapacidad de las células que carecen de β 2-microglobulina de expresar cantidades significativas de moléculas de clase I en la superficie de la membrana (Zamoyska y Parnes, 1988). A pesar de esto, el requerimiento de β 2-microglobulina en el transporte de clase I, no parece ser imprescindible; un bajo nivel de algunas moléculas pesadas pueden ser detectadas en la superficie de las células que carecen de la expresión de β 2- microglobulina (Williams y cols., 1989; Zijlstra y cols., 1990). La separación de p88 ocurre en el RE cuando el complejo clase I-péptido comienza a moverse hacia el cis-Golgi, pasando a continuación al trans-Golgi y finalmente a la superficie celular donde finaliza la ruta de secreción. En la figura 12 queda reflejado el modelo de procesamiento y presentación de antígeno por moléculas de clase I.

7.2. PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO POR MOLÉCULAS DE CLASE II

Las moléculas de clase II presentan generalmente péptidos derivados de antígenos exógenos, y en algunas ocasiones, de antígenos generados endógenamente por la célula. La presentación de antígeno exógeno por las moléculas de clase II está determinada por la interacción de la ruta endocítica de procesamiento de estos antígenos exógenos y la ruta de transporte de las moléculas de clase II hacia la superficie celular. En la figura 13 se muestra el esquema general de procesamiento y presentación por este tipo de moléculas. Este proceso consta de los siguientes pasos que ahora se describen brevemente y que se detallarán a continuación:

- Internalización de proteínas antigénicas extra-celulares por parte de las CPAs.
- Procesamiento del antígeno en endosomas o lisosomas ácidos, generando fragmentos peptídicos.
- Unión del péptido a moléculas de clase II.
- Expresión del complejo MHC clase II-péptido en la superficie celular.

La mayoría de los antígenos exógenos (que incluyen proteínas sintetizadas por virus, bacterias, hongos, parásitos y proteínas administradas durante una inmunización) son procesados en la ruta endocítica (Pierce y cols., 1988). El paso inicial es la unión del antígeno nativo a una célula presentadora de antígeno. Diferentes CPAs pueden unir la proteína antigénica por diferentes rutas y con distinta especificidad. Varios minutos después, el antígeno es internalizado mediante endocitosis (fagocitosis o pinocitosis). Inicialmente, el antígeno internalizado se localiza en unas vesículas intracelulares llamadas endosomas (primero en los endosomas tempranos y después en los endosomas tardíos). Las características estructurales y bioquímicas de estos orgánulos no están muy bien descritas, son mejor conocidos por su función en el transporte intracelular y en la degradación de las proteínas internalizadas. La ruta endógena de tráfico de proteínas en la célula continúa en los lisosomas, estructuralmente diferentes de los endosomas y con un elevado contenido enzimático (Lippincott-Schwartz y cols., 1991).

El siguiente paso es el procesamiento del antígeno que ha sido internalizado en su forma nativa y que tiene lugar en endosomas y lisosomas debido al pH ácido que existe en su interior y al elevado contenido en proteasas celulares. Esto se ha observado porque agentes que aumentan el pH de las vesículas intracelulares, como cloroquina y cloruro amónico, inhiben el procesamiento del antígeno. Inhibidores de proteasas también bloquean este proceso. La función de las proteasas es romper la proteína nativa en péptidos pequeños. Muchas proteasas celulares necesitan un pH ácido para actuar en condiciones óptimas, por este motivo el procesamiento del antígeno se lleva a cabo en compartimentos ácidos.

El resultado del procesamiento es la generación de péptidos de 10-30 aa que son capaces de unirse a las moléculas de clase II. Diferentes CPAs pueden generar diferentes grupos de péptidos a partir de la misma proteína nativa, debido a las diferencias en el contenido de proteasas endosomales.

Las moléculas de clase II se sintetizan en el RE, donde se unen también de forma transitoria a la cadena invariable (Cresswell y cols., 1990). Como ya se ha mencionado, dicha asociación evita la unión de péptidos libres provenientes del citosol mediante la unión del segmento CLIP de la cadena invariable que cierra el sitio de unión del péptido de la molécula de clase II (Roche y Cresswell, 1990; Teyton y cols., 1990; Riberdy y cols., 1992). En ausencia de Ii, los monómeros α y β de clase II no dimerizan, aunque, sufren homoagregación y se asocian con proteínas BIP (Bonnerot y cols., 1994), grp 94 y p72 (Schaiff y cols., 1992), siendo posteriormente degradadas (Neefjes y Ploegh, 1992). La Ii posee una secuencia señal en el extremo citoplásmico que la retiene en el RE hasta que se produce el ensamblaje con la molécula de clase II. Posee también otra secuencia señal que dirige el complejo clase II-Ii desde el RE hasta las vesículas que se desprenden del trans-Golgi, pasando previamente por el cis-Golgi (Lotteau y cols., 1990). No se sabe con certeza si Ii es absolutamente necesaria para la salida de la molécula de clase II del RE y para la adquisición del péptido, si bien, los datos obtenidos a partir de animales deficientes en la expresión de la cadena invariable (Viville y cols., 1993; Bikoff y cols., 1993) indican que a pesar de la capacidad de las moléculas de clase II de acceder a los endosomas sin Ii, la presencia de la misma juega un papel importante en la adquisición del péptido; prueba de ello es que la mayoría de las moléculas de clase II expresadas en la superficie de las células que no poseen Ii, están vacías.

La unión de las moléculas de clase II al péptido, parece llevarse a cabo en lisosomas túbulo-vesiculares en macrófagos activados (Harding y Geuze, 1992) y en un compartimento semejante a los lisosomas, llamado MHC en el caso de los linfocitos B (Peters y cols., 1991). Los complejos clase II-Ii podrían estar en contacto con el antígeno internalizado mientras tienen lugar procesos de fusión entre endosomas tempranos, que preceden a la maduración de endosomas tardíos. Esta actividad puede ser promovida

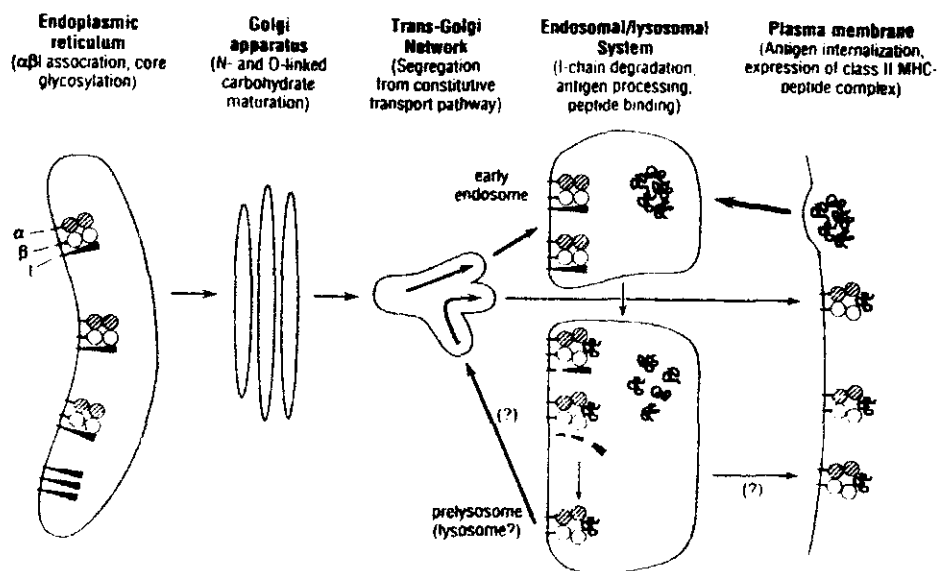
específicamente por Ii, cuya expresión aumenta el tamaño de los endosomas tempranos y retrasa la aparición de los endosomas tardíos y de los lisosomas (Romagnoli y cols., 1993). Durante la estancia final del complejo clase II-Ii en los endosomas, el pH ácido y las proteasas fragmentan progresivamente la porción terminal -COOH de Ii (Blum y Cresswell, 1988). Finalmente una proteasa determinada podría eliminar el segmento CLIP, dejando el sitio de unión de la molécula de clase II accesible al péptido.

La unión selectiva de la molécula de clase II a secuencias peptídicas capaces de formar complejos estables, puede ser promovida por el bajo pH de estos compartimentos (Jensen, 1990). Diversas observaciones experimentales sugieren que la molécula de clase II interacciona primero con proteínas no completamente plegadas, esto permitiría preservar a los determinantes peptídicos de una degradación excesiva. Los péptidos expresados en superficie serían creados por digestión del antígeno situado fuera de la región protegida por el sitio de unión de la molécula de clase II (Secarz y cols., 1993).

Mediante la purificación, secuenciación y determinación del origen de péptidos asociados a clase II, se ha visto que la mayoría provienen de la ruta endocítica (Chicz *et al.*, 1993). Algunos provienen de proteínas solubles del suero bovino fetal utilizado en el medio de cultivo, aunque la mayoría provenían de la degradación de proteínas de superficie, internalizadas y degradadas durante el reciclaje normal.

En la fig. 14 (tomada de Cresswell, 1994) se muestran las hipótesis que existen sobre el transporte de las moléculas de clase II. Se representa de forma esquemática el nonámero formado por las cadenas α y β y la li. El complejo clase II-li se transporta a un endosoma temprano a través del aparato de Golgi, para seguir camino hacia un prelisosoma, donde se postula que sucede el procesamiento. Después de la degradación de la li, los dímeros $\alpha\beta$ son devueltos al TGN y desde allí a la superficie celular. Esta ruta, como ya hemos mencionado, se desconoce. Por otra parte, el antígeno es internalizado hasta un endosoma temprano y después, al igual que las moléculas de clase II, a un prelisosoma. Aquí se realiza la proteólisis del Ag y de la li, los péptidos resultantes se unen a los dímeros de clase II y desde aquí siguen el mismo camino.

Figura 14.- Esquema del transporte de las moléculas de clase II desde el RER hasta la superficie celular, mostrando las diversas posibilidades que se han propuesto. Ver



texto. (Tomado de Cresswell, 1994).

La formación del complejo clase II-péptido, tiene lugar fundamentalmente por el procesamiento a través de la vía endocítica como ha sido descrito, sin embargo, existen otras rutas de procesamiento alternativas para la generación de dichos complejos:

Se ha sugerido la internalización de las moléculas de clase II y el intercambio de los péptidos unidos a ellas, por otros péptidos distintos de la ruta endocítica. Los resultados de estos estudios son bastante

contradictorios. Hay autores (Davidson *et al.*, 1991) que comentan que la exposición rápida a un endosoma de reciclaje no sería suficiente para eluir el péptido unido e intercambiarlo por otro nuevo.

Debido a determinadas respuestas de linfocitos T frente a complejos clase II-péptido y mediante el análisis de los péptidos eluidos, se han detectado en la superficie celular complejos cuyo péptido es el producto de la degradación de proteínas sintetizadas endógenamente (Malnati *et al.*, 1992). Uno de estos casos incluye procesos de autofagia, que se inician con la formación de fagosomas mediante vesicularización, por ejemplo, de mitocondrias o fragmentos de RE (Dunn, 1990a, b). Estos fagosomas, se fusionarían con lisosomas y endosomas, procesando así péptidos provenientes del citoplasma.

Otras proteínas citosólicas, sintetizadas endógenamente, son degradadas por los lisosomas, como es el caso de la lisozima (Harding *et al.*, 1991). Se ha sugerido (Brodsky y Guagliardi, 1991; DeNagel y Pierce, 1992) que desde los lisosomas, probablemente mediante mecanismos que implican transporte mediado por chaperoninas, los péptidos pasarían a endosomas para asociarse con las moléculas de clase II. Se ha descrito la influencia de las citoquinas sobre la tasa de procesamiento antigénico. Concretamente, en monocitos humanos se ha detectado un aumento del procesamiento de Ag a las 4 horas de la incubación con IFN- γ , mientras que a las 48-72h de incubación existe una disminución de la tasa de procesamiento antigénico. El efecto es dependiente de la concentración de IFN- γ y, curiosamente, los péptidos procesados en las células tratadas parecen diferentes en alguna medida de los presentados en las células sin tratar (Nadler y cols., 1994).

La mayoría de los datos existentes muestran que los complejos clase II-péptido se forman por la interacción de moléculas nuevas de clase II con péptidos generados endocíticamente (Cresswell, 1994).

De los resultados obtenidos con líneas mutantes deficientes en procesamiento antigénico se ha demostrado la existencia de otras proteínas que regulan el procesamiento antigénico y la unión a las moléculas de clase II (Mellins *et al.*, 1990). Por experimentos de fusiones somáticas de estos mutantes se ha demostrado que todos pertenecen al mismo grupo de

complementación (Mellins *et al.*, 1991). En estos mutantes los primeros pasos del procesamiento de las moléculas de clase II parecen normales. Las últimas etapas del transporte clase II-II se parecen ser anormales. Los complejos clase II-II se acumulan en unas vesículas similares a los MHC excepto por su morfología. La proteólisis de la II parece ser muy lenta y las moléculas de clase II no parecen tener nunca el fenotipo característico de los dímeros $\alpha\beta$ típicos, por lo que se supone que estas moléculas no están asociadas a péptidos. Sin embargo, cuando estas moléculas son aisladas se observa que están asociadas a péptidos derivados de la II (CLIP, mencionados anteriormente) (Cresswell, 1994). Esto podría indicar que la cadena invariable o los péptidos provenientes de su proteólisis, permanecerían unidos a las moléculas de clase II por no haber competencia por ellas al no existir péptidos procesados. Es decir, es necesaria la presencia de péptidos procesados por que la molécula de clase II se exprese correctamente en superficie.

Nuestro trabajo trata de clarificar estos procesos mediante el uso de líneas linfoblastoides humanas que, provenientes de líneas parentales que expresan clase II constitutivamente, han perdido esta expresión por procesos de mutagénesis. Estas líneas, como se ha visto a lo largo de esta introducción, se utilizan frecuentemente para estudios de regulación de la expresión y del procesamiento y presentación del antígeno.

La elucidación de estos procesos naturales, ayudaría al entendimiento de la etiología de las enfermedades autoinmunes, generalmente relacionadas con la expresión de determinados alelos del MHC (Bugawan y cols., 1989; Nepom y Erlich, 1991; Nepom y cols., 1991; Richeldi y cols., 1993), tales como la diabetes melitus dependiente de insulina (IDDM), la enfermedad celíaca, la artritis crónica juvenil, la beriliosis, etc.

Por otra parte, ya que las moléculas de clase II presentan una regulación de su expresión tan especial, debido a los múltiples factores que la afectan, desde el estado de diferenciación de la célula hasta determinados contactos intercelulares, pasando por la inducción por citoquinas, es de la mayor importancia, desde el punto de vista de la investigación básica, el desentrañar cómo se orquesta y controla esta expresión.

II. OBJETIVOS

En este trabajo se proponen los siguientes objetivos:

1. Estudiar la expresión de los mRNA para las cadenas α y β de las moléculas de HLA-DP2 en las líneas mutantes haploides y comprobar si existen diferencias para las dos cadenas de las moléculas de HLA-DP entre los mutantes haploides y respecto de la línea parental 45.1.
2. Clasificar las LCLs mutantes haploides según el defecto responsable de la falta de expresión de HLA-DP: afectados en secuencias reguladoras (*cis*) o en factores activadores de la transcripción (*trans*).
3. Estudiar las secuencias promotoras de los mutantes con defectos en *cis*.
4. Establecer los posibles grupos de complementación entre las LCLs mutantes haploides posiblemente dañadas en algún factor en *trans*.
5. Estudiar el efecto de algunas linfoquinas sobre la expresión de moléculas de clase II de las LCLs mutantes haploides.
6. Caracterizar, a nivel molecular, el defecto responsable de la falta de expresión de DPw2 en la LCL mutante diploide 721.EM5 y en las líneas haploides 45.EM3 y 45.EM15.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Productos químicos y biológicos

Los productos que se utilizaron en este trabajo fueron suministrados por las siguientes firmas comerciales:

- Los productos químicos, de Merck (Darmstadt, RFA), Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA), Flucka (Buchs, Suiza), Probus (Barcelona), BDH (Poole, Inglaterra) y Panreac (Barcelona).

- Los medios utilizados para los cultivos celulares, de Bio-Whittaker, (Walkersville, MD) así como el Suero de Ternera Fetal, la glutamina y la penicilina-estreptomicina.

- Los productos radiactivos de Amersham International (Amersham, Inglaterra). Las películas de autorradiografía de Kodak (España).

- Los productos de biología molecular de Boehringer Mannheim, Pharmacia, BRL Inc., New England Biolabs y Sigma Chemical Co.

2. Material plástico

Los materiales estériles que se utilizaron fueron los siguientes:

- frascos T25 y T50 (Nunc)
- placas multipocillo p96, p24 (Nunc)
- viales de congelación de capacidad 1.8 ml (Nunc)
- pipetas estériles de un solo uso
- tubos estériles de 10 ml (Nunc)
- tubos falcon estériles de 50 ml (Nunc)
- filtros estériles Minisart de 0.2 µm (Sartorius)
- jeringas estériles de 1, 10 y 50 ml (Becton-Dickinson).

3. Equipo instrumental

Para la realización de este trabajo se utilizaron los siguientes aparatos:

Autoclaves: Selecta y Clinomatic

Balanza de precisión: Santer D-7470

Baños termostatzados: Selecta FrigitermSBS y TFB.

Baño de agitación: Selecta Unitronic 320

Bomba de vacío: Millipore xx5522050

Campana de flujo laminar: Telstar

Centrifugas: Beckman J.2-21 con rotor JA-21, Selecta, Meditronic (Quimilab); ultracentrifuga Beckman L8-70, con rotores fijo y de balanceo; microfugas: MSE, Sigma 101M, Biofuge A (Heraeus) y Sorvall Microspin 24. Kubota para tubos (Kubota, Ky, Japón).

Citómetros de Flujo: FACScan y FACSTAR PLUS (Becton-Dickinson, San José, CA).
Congeladores de -20°C: Philips, Selecta y Kelvinator.
Congeladores de -80°C: Herafreeze (Heraeus)
Contador portátil Geiger: Mini.monitor GM tube
Contador de centelleo líquido: PW 4700 Philips
Contenedor de N₂ líquido: CDB 47 Carburos metálicos
Cubeta de electroforesis de ácidos nucleicos: Bio-Rad wide mini- subcell, Bio-Rad DNA subcell.
Densitómetro: PD, Molecular Dynamics (San Diego, CA).
Espectrofotómetros: Beckman 35 y Bausch-Lomb espectral 20.
Estufa de cultivo de 37°C: Heraeus electronic.
Fuentes de alimentación: LKB 2197, Bio-Rad 250/215 y Bio-Rad 2000/200.
Granatario: Mettler Pc-400 y Precisa 310 C-3010 D.
Horno eléctrico: Selecta.
Horno microondas: Moulinex.
Incubadores de agitación a 37°C Gallenkamp IH-460
Incubador de CO₂: Function Line Heraeus.
Lámpara de luz UV: Uvatom-70.
Liofilizador: Virtronics.
Máquina de hielo picado: Scotsman AF-10.
Microscopio Confocal MRC-1000 Bio-Rad.
Microscopios ópticos: Nikon Optiphot con contraste de fases, Olympus BH2 y Nikon phase contrast ELDW 0.3.
pH-metros: Meteor 996 y Crison micro pH 2002.
Pipetas: Acuboy (Tecnomara).
Plataformas magnéticas: Huco Erlöss y Selecta Agimatic termostataza.
Secuenciador Automático de DNA ALF (Pharmacia).
Sintetizador de Oligonucleótidos (Pharmacia).
Sistema de purificación de agua: Millipore: Milli-Q y Milli-Ro4
Transiluminador de UV: Ultravioleta Products Co. Chromatovue C-61.

MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1 Líneas celulares utilizadas

1.1.a. LCLs humanas

Son líneas linfoblastoides (LCLs) obtenidas por transformación de linfocitos B de sangre periférica con el virus de Epstein-Barr. En el presente trabajo se utilizaron las siguientes LCLs:

-LCLs utilizadas como controles: amablemente cedidas por el Dr. R. DeMars:

721: LCL diploide para HLA (A2-B5-Cw1-DR1-DQw1-DPw2 y A1-B8-Cw7-DR3-DQw2-DPw4). (Kavathas y cols., 1980)

721.45: LCL haploide para HLA generada a partir de la anterior 721 por mutagénesis con radiación gamma y posterior selección con anticuerpo y complemento.

(A2-B5-Cw1-DR1-DQw1-DPw2 (DPA1*0301, DPB1*02012)). (Kavathas y cols., 1980). (Tonelle y cols., 1985).

721.127: LCL haploide para HLA (A1-B8-Cw7-DR3-DQw2-DPw4) generada también a partir de 721, por un proceso similar al anterior (De Mars y cols., 1983).

721.180: generada a partir de 721.45 por radiación gamma y selección con anticuerpo anti-clase II, CC11.23 (De Mars y cols., 1984). Este mutante no expresa clase II (DR- DQ- DP-).

SJO: Línea linfoblastoide HLA - proveniente de pacientes con inmunodeficiencias congénitas. Amablemente cedida por el Dr. J. Gorski (Milwaukee, WI).

HeLa línea epitelial proveniente de un carcinoma de cuello de útero. Amablemente cedida por el Dr. Luis Carrasco (CBM).

-LCLs mutantes obtenidas en este laboratorio: mediante mutagénesis con ICR191 de las líneas 721 y 45.1 y posterior selección con CTLs aloespecíficos para DPw2:

- Generados a partir de la línea 721, diploide para HLA: 721.EM1, 721.EM2, 721.EM5 y 721.EM6.

- Generados a partir de la línea 45.1, haploide para HLA : 45.EM1, 45.EM3, 45.EM5, 45.EM7, 45.EM8, 45.EM9, 45.EM11, 45.EM13, 45.EM14, 45.EM15, 45.EM16, 45.EM18 y 45.EM19.

1.2 Mantenimiento

Las diferentes líneas celulares se mantuvieron en viales en nitrógeno líquido (en un ambiente de -173°C) hasta ser descongeladas y expandidas para ser utilizadas en los diferentes ensayos.

1.3 Congelación y descongelación de las líneas celulares

Para su congelación, 5×10^6 células se recogieron a 300g durante 5' y se resuspendieron en 0.5 ml de medio de cultivo. Se añadió gota a gota y agitando suavemente 0.5 ml de medio de congelación compuesto por 80% de STF y 20% dimetil sulfóxido (DMSO). El volumen final se transfirió a viales de congelación que se mantuvieron: 3 horas a -20°C , 24 horas a -70°C y finalmente se pasaron a nitrógeno líquido.

La descongelación de las diferentes líneas se llevó a cabo a 37°C . Una vez descongelado el vial se transfirió inmediatamente el contenido a un tubo con 9 ml de medio de cultivo. Se centrifugó (5 minutos, 300g) y el precipitado celular se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo. Las células se cultivaban en frascos de cultivo estériles a 37°C en atmósfera de 5% de CO_2 y humedad del 98%.

1.4 Crecimiento de las líneas celulares

El medio de cultivo utilizado para crecer las LCLs fue el siguiente:

- RPMI 1640 sin L-Glu (Gibco)
- Penicilina (Flow): 50 U/ml de medio de cultivo.
- Estreptomicina (Flow): 50 mg/ml.
- L-glutamina (Flow): 2mM concentración final.
- Suero de ternera fetal (Flow) previamente inactivado a 56°C durante 30 min. a una concentración final del 10%.

Los cultivos se crecieron a 37°C en una atmósfera del 5% de CO_2 y una humedad del 98%.

2. ANTICUERPOS MONOCLONALES UTILIZADOS

En este estudio se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales:

B7/21 es una IgG 2a anti DP (Royston y cols., 1981; Watson y cols., 1983) obtenido por el Dr. J. Trowbridge (Scripps Clinic, La Jolla, CA.), y amablemente cedido por el Dr. Federico Garrido (Hospital Virgen de las Nieves, Granada).

ILR1 es una IgG 2b que se une a un subtipo del alelo de clase II incluido el DPw2 (Nadler y cols., 1981; Hurley y cols., 1982) amablemente cedido por el Dr. L Nadler (Dana Faber Institute, Boston MA).

DP11.1 es una IgG1 que se une a DPw4 y con menos intensidad al de DPw2 cedido por el Dr. Trowsdale (Heyes y cols., 1985).

L243, monomórfico para DR, (Lampson y Levy, 1980) es una IgG2a. (Becton-Dickinson, San José, CA).

33.1, reconoce el alelo DQ2, IgG2.

Lista de anticuerpos utilizados en el estudio de la línea celular 721.EM%, cedidos por el Dr. DeMars.

ANTICUERPO	EPÍTOPO PROPUESTO	ESPECIFICIDAD
NFLD.M60	"DE" en 55-56	3, 9, 10, 14, 17 & DR11, débil en 2.1 y en 4.2
NFLD.M63	≅ M60	3, 4.2, 9, 14
NFLD.M64	≅M60	2.1, 3, 4.2, 9, 10, 14, 16, 17 & DR11
NFLD.M66	"AV" en 85-86	Todos - 2s, 4s, 15, 18
NFLD.M67	MONOMÓRFICO DP	
NFLD.M68	MONOMÓRFICO DP	
NFLD.M69	MONOMÓRFICO DR+DP	
NFLD.M70	CADENA α (02)	Todos con DPA1.0201
NFLD.M73	=M60	Débil DP1
NFLD.M75	≅M63	
NFLD.M77	"L" en 11 & "FV" en 35-36	3, 6, 9, 10, 14, 17
NFLD.M101		2, 3, 4, 6, 9, 10, 14, 16, 17 & DR11

3.FUSIONES DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Se siguió el método descrito en el Current Methods of Immunology.

1. Se cogían las células de los dos mutantes a fusionar (relación 1:1) en un tubo cónico de 50 ml. Se llenaba el tubo con RPMI 1640 sin suero ni antibióticos.

2. Se centrifugaban las células 1.200 r.p.m. 5 minutos.
 3. Todos los medios estaban a 37°C.
 4. Con una pipeta de 1 ml se añade 1 ml de Polietilenglicol (Merck) (PEG) al 50% en RPMI 1640 a las células, procurando que caiga gota a gota y durante un minuto, agitando a la vez las células con la punta de la pipeta. Se continuaba agitando durante 1 minuto más.
 5. Con una pipeta limpia añadía 1 ml de RPMI 1640 sin suero, de la misma forma que en el paso anterior y durante el mismo tiempo y se repetía otra vez el proceso.
 6. Se añadían 7 ml del mismo medio sin suero, gota a gota durante 2-3 minutos.
 7. Se centrifugaban las células 5 minutos a 1.200 r.p.m.
 8. Las células se resuspendían en RPMI 1640 al 10% de suero a una concentración de 5 millones por ml, agitando suavemente para evitar la ruptura de los híbridos recién formados.
 9. La suspensión de células se ponían en frascos de 25cm² en medio completo de cultivo y se mantenían durante dos días, al cabo de los cuales se teñían con AcM para observar la posible recuperación de la expresión de HLA-DP.
- Para este estudio se han realizado del orden de 300 fusiones.

4. ESTUDIOS DE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA Y CITOMETRÍA DE FLUJO

4.1 Tinción de superficie

Las células (1×10^6) fueron recogidas y centrifugadas a 900 g durante 5 min. A partir de este momento se realizaron las posteriores manipulaciones a 0°C (en hielo). Las células se incubaron con 50 µl del AcM correspondiente durante 30 minutos en hielo. La dilución utilizada fue 1:50 cuando se trataba de ascitis o 1:5 o sin diluir (dependiendo de las pruebas de titulación) cuando se trataba de sobrenadante de cultivo.

Las células se lavaban posteriormente dos veces con PBS con el fin de eliminar el anticuerpo no unido. La segunda capa consistía en un fragmento F(ab)'₂ de una IgG de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con fluoresceína (Sigma) que se utilizaba a la dilución 1:100 y se incubaba con las células 30 minutos en hielo. Transcurrido ese tiempo, el anticuerpo no unido era eliminado mediante 3 lavados sucesivos con PBS.

Para llevar a cabo dobles marcajes se seguía el protocolo descrito y a continuación se incubaban las células con L243 directamente conjugado con ficoeritrina (Becton-Dickinson) a una dilución 1:100, durante 30 minutos en hielo.

Finalmente, se resuspendieron las células en un volumen de 300 µl de PBS con 0.005% de Yoduro de Propidio (Sigma), para discriminar las células muertas.

Las células se analizaron en el citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson, San José, CA) del Centro de Citometría de la U.C.M. Para cada muestra se recogían 10000 datos individuales, y el análisis de éstos se

realizaba con el programa informático "Lysys II" y "Cellquest" (Becton-Dickinson),

En el caso de los híbridos somáticos, la determinación del porcentaje de positividad se realizaba en función del porcentaje de híbridos. Este último era obtenido mediante el acotamiento en FSC y SSC, mostrado en la figura 19. Para eliminar la región donde aparecen los híbridos se realizaron separaciones celulares en función del FSC y SSC hasta que se obtenía un porcentaje de híbridos cercano al 98%. Por lo tanto, los cálculos siempre están subestimados, ya que algunos híbridos aparecen en otras zonas de la representación pero no son tenidos en cuenta. Aún así, ya que no interesaba tanto la cuantificación como la detección de híbridos positivos, nos pareció mucho más claro y menos erróneo cuantificar los híbridos dentro de la zona de máxima aparición de híbridos.

Antes de realizar este estudio se comprobó la proporción de células binucleadas presentes en los cultivos de las diferentes líneas celulares utilizadas en los experimentos de fusión. En ningún caso la proporción fue mayor del 0.2%.

4.2 Tinción intracitoplásmica

Las células (1×10^6) fueron recogidas de los frascos de cultivo y centrifugadas a 900 g durante 5 min., se lavaban dos veces con PBS-0.2% de BSA y se fijaban utilizando tampón BFA pH 7.0 (PO_4HNa_2 1.4 mM, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 5.7 mM, acetona 40%, formaldehído 25 % y agua 30%) durante 10 minutos a T° ambiente.

Se eliminaba el BFA lavando varias veces con PBS. Las células ya fijadas eran teñidas siguiendo el protocolo detallado en el apartado anterior, excepto el paso con Yoduro de Propidio.

Se probaron otros protocolos de permeabilización y fijación (saponinas, formaldehído-glutaraldehído, etc.), pero con nuestras células y en nuestras condiciones, los mejores resultados se obtuvieron con BFA.

4.3 Separación celular por Citometría de Flujo:

La separación celular se llevaba a cabo después de realizar una tinción en superficie y analizar las células en el citómetro de flujo FACScan. La separación se realizaba sobre portas para observar las células al microscopio y fotografiarlas.

La separación se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACStar Plus (Becton-Dickinson). El proceso de separación siempre se llevó a cabo utilizando condiciones de máxima pureza y mínimo rendimiento. La velocidad de la separación solía ser de 20 células/segundo. La observación microscópica de las células separadas ponía de manifiesto puridades en torno al 98%.

Las fotografías se hicieron en un microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot, con película Ilford 400 ASA B/N, película para diapositiva Agfachrome 100 ASA (Agfa, Leverkusen, GE) y película en color para papel Kodak 400 ASA.

5. MICROSCOPIA CONFOCAL

Después de teñidas las células con los anticuerpos correspondientes y antes o después de analizarlas por citometría de flujo se procedió a su observación por microscopía confocal. El microscopio confocal del CCF de la UCM utilizado (MRC1000, Bio-Rad) permite el análisis de dos fluorescencias, además de la imagen confocal transmitida, con lo que era posible detectar las células dobles positivas polinucleadas. Se adquirían estas imágenes confocales para ser procesadas con el programa COMOS que permite solapar las dos fluorescencias. Posteriormente, se realizaron fotos directamente de las imágenes en pantalla con una máquina Nikon F301.

Algunas veces, se trataban las imágenes mediante el programa Adobe Photoshop (Adobe systems), y eran transferidas al procesador de texto o a película fotográfica.

6. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CLASE II POR CITOQUINAS

Se alicuotaban 10^6 células por pocillo en placas de 24 pocillos (Costar) (8 pocillos por línea celular: 2 por tratamiento y 2 controles). Los tratamientos fueron incubación con IFN- γ a una concentración de 100U/ml, incubación con IL-4 a 2U/ml e incubación con las dos citoquinas. Al cabo de 24 horas se recogían células de cada tratamiento (cuatro pocillos por línea celular), se teñían con AcM anti-DP, anti-DR y anti-DQ, siguiendo el protocolo descrito anteriormente) y se analizaban por citometría de flujo. A las 48 horas se repetía la operación. Se ponía especial cuidado en utilizar siempre la misma cantidad de células para la misma cantidad de anticuerpo, para no tener variaciones debidas al protocolo. Lo que se esperaban eran variaciones en el número de moléculas en la superficie celular por lo que se estudiaba eran las diferencias en la intensidad media de fluorescencia en cada caso. Lo que se representa en las gráficas son unidades arbitrarias de intensidad media de fluorescencia. En el caso de las líneas mutantes deficientes en la expresión de HLA-DP, también se observó la posible existencia en el número de células negativas y positivas, aunque nunca hubo variaciones en este parámetro.

7. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Los métodos empleados en la manipulación de ácidos nucleicos se basaron fundamentalmente en los descritos en los manuales de Biología Molecular de Maniatis y cols., (1982) y Glover (1986).

7.1 Cultivos bacterianos :

Los medios de cultivo utilizados habitualmente para el crecimiento de bacterias han sido LB (Luria-Bertani) que se compone de: Triptona 1%, extracto de levadura 0,5% y NaCl 1% y T.B (Terrific broth): Triptona 1,2%, Extracto de levadura 2,4%, Glicerol 0,4%(v/v) al que se añadía en el momento de utilizarlo un 10% de una solución estéril de fosfatos 0,72M de K_2PO_4 y 0,17M KH_2PO_4 estéril. Para obtener placas de cultivo con medio sólido se añadía a los medios anteriores 1,5% de Bacto-agar antes de esterilizar en el autoclave. En caso necesario estos medios fueron suplementados con: ampicilina (100 mg/ml), IPTG y X-Gal.

La cepa bacteriana utilizada normalmente para la transformación fue *E. coli* DH5 que posee alta frecuencia de transformación (Hanahan, 1985). También se utilizó la cepa DH5 α , que es igual a la anterior, pero portadora de una delección en el operón lac, lo que permite la selección de clones que llevan inserto en presencia de X-Gal e IPTG.

En los experimentos de mutagénesis dirigida se utilizaron dos cepas de *E. coli*: MV1190 y CJ236.

Genotipos de las cepas utilizadas:

E. coli DH5: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *hsdR17*, *supE44*, (*rk*⁻, *mk*⁺), *xil*⁻, *F*⁻.

E. coli DH5 α : *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *hsdR17*, *supE44*, (*rk*⁻, *rk*⁺), *relA1*, *f80*^R, *lacZ* Δ M15, *F*⁻.

E. coli MV1190: Δ (*lac-pro* AB), *thi*, *supE*, Δ (*sr1-recA*) 306::Tn10 (*tet*^r) {*F*⁺:*traD36*, *pro* AB, *lac* *l*^q*Z* Δ M15.

E. coli CJ236: *dut*, *ung*, *thi*, *relA*, pCJ105(*Cm*^r).

7.2 Plásmidos utilizados:

- pcDV1-DPA1*0103 y pcDV1-DPB1*02012: cedidos por el Dr. E.O.Long y obtenidos a partir de una genoteca de cDNA de la línea celular 45.1 en el plásmido pcDV1 (Tonelle y cols., 1985). Llevan insertados los cDNAs de HLA-DPA1*0103 y HLA-DPB1*02012.

- pMxNeo: cedido por el Dr. Martín Zanca. Lleva como promotor la LTR del virus murino del sarcoma de Maloney, las señales de poliadenilación de SV40 y el gen de resistencia a G418.

- RSV5gpt y RSV5Neo: cedidos por el Dr. E. O. Long. Utilizan como promotor la LTR del virus del Sarcoma de Rouse. El primero porta la resistencia a ácido micofenólico y el segundo a G418 (Long y cols., 1991).

- M13mp19 y pUC19 (Vieira y cols., 1982).

- pHEBo: cedido por el Dr. Sudgen. Lleva el "oriP" del virus de Epstein-Barr, lo que le permite replicarse de forma autónoma en células infectadas con este virus. Como gen de resistencia lleva el de resistencia a higromicina B (Sudgen y cols., 1985).

- pBEX1: cedido por el Dr. Gorsky. Este plásmido lleva el gen de resistencia a higromicina B y el EBV oriP del pHEBO y como promotor el promotor temprano y zona amplificadora del Citomegalovirus (Maurer y cols., 1991).

7.3 Soluciones de uso general

Las soluciones empleadas comúnmente en los métodos de biología molecular, se describen a continuación:

Tampón TE.

Tris-HCl pH:8 10 mM, EDTA 1 mM

Se empleaba para el mantenimiento a 4°C de los DNAs.

Etanol absoluto y Etanol al 70%.

El primero se empleaba 2:1 (vol:vol), junto con acetato sódico para precipitar ácidos nucleicos. El segundo se utilizaba para, una vez realizada la precipitación, lavar el precipitado con objeto de eliminar sales.

Isopropanol.

Se utilizaba (vol:vol) para precipitar ácidos nucleicos.

Acetato sódico 3 M.

Solución 3 M, ajustada a pH 5,2 con ácido acético. Se utilizaba como sal de precipitación de ácidos nucleicos, a una concentración final de 0,3 M, junto con 2 volúmenes de etanol absoluto.

Cloroformo.

Solución de cloroformo/alcohol isoamílico en la proporción 24:1, utilizada para desproteinizar ácidos nucleicos y para eliminar restos de fenol de la solución.

Fenol.

Es una solución de fenol equilibrada a pH >7,6 en TE, que contiene 0,1% de hidroxiquinoleína y 0,2% de β-mercaptoetanol. Se empleaba para eliminar proteínas de soluciones de ácidos nucleicos.

Éter.

A veces se empleaba, saturado de agua, para eliminar trazas de fenol o cloroformo. Se eliminaba calentando a 68°C durante 10 minutos.

DNA de espermatozoos de salmón.

Se utilizaba en las soluciones de hibridación de ácidos nucleicos, para reducir las fijaciones inespecíficas de las sondas a las membranas de nylon. Se preparaba disolviendo el DNA fragmentado, hasta 10 mg/ml, en TE. Se rompía por sonicación y a continuación se desproteinizaba con fenol, cloroformo y éter. Finalmente se precipitaba con dos volúmenes de etanol.

noI/NaCl 0,1 M a -80°C, durante 1 hora; se lavaba con etanol al 70% y se diluía en TE a una concentración final de 10 mg/ml.

tRNA transportador ("carrier").

La preparación era básicamente igual que el DNA de espermatozoide de salmón, pero sin sonicar. Se diluía a la concentración final del 1%. Se empleaba en ocasiones para facilitar la precipitación en muestras de ácidos nucleicos.

El agua empleada en todas las soluciones era ultrapura. Las soluciones se esterilizaban en autoclave o por filtración.

7.4 Transformación de *E. coli*.

La transformación de cepas de *E. coli* se llevaba a cabo por el método de Mandel y Higa (1970).

Una colonia procedente de un cultivo reciente en placa de LB, se inoculaba en 10 ml del mismo medio y se incubaba a 37°C con agitación durante una noche.

0,5 ml de este cultivo eran transferidos a un matraz con 50 ml de LB y se incubaban a 37°C con fuerte agitación, hasta alcanzar una concentración de 7×10^7 células/ml ($DO_{600} = 0,5$). Seguidamente el cultivo se enfriaba en hielo durante 10 minutos. A partir de aquí todas las soluciones eran enfriadas a 0°C. Posteriormente se centrifugaba (en el rotor JA-20 de una centrifuga Beckman J.2-21) a 7.000 rpm, a 4°C durante 5 minutos y se resuspendían las células en 20 ml de $CaCl_2$ 0,05 M. Tras mantener la suspensión en hielo durante 15 minutos, se volvía a centrifugar en las mismas condiciones y se diluía en 3 ml de $CaCl_2$ 0,05 M. Entonces se repartía la suspensión en alícuotas de 200 µl en tubos Eppendorf fríos.

Se añadía a cada tubo el DNA plasmídico, se mezclaba suavemente y se incubaba en hielo durante 25 minutos. A continuación se daba un choque térmico en baño a 42°C durante 2 minutos y se añadía 1 ml de LB. Tras incubación durante 1 hora a 37°C, se sembraba en placas de medio LB suplementado con ampicilina y se mantenía una noche a 37°C, hasta aparición de colonias.

7.4.1 Selección de clones transformantes de *E. coli* portadores de vectores con inserto.

Cuando se querían seleccionar transformantes de plásmidos que portaban el gen *lac*, se plaqueaban en LB con el antibiótico adecuado y X-Gal e IPTG. En aquellos transformantes con plásmido sin inserto el X-Gal es hidrolizado por la β-galactosidasa dando coloración azul. Sin embargo, cuando el transformante porta un plásmido con inserto no se produce β-galactosidasa y por tanto las colonias de transformantes son blancas.

7.5 Aislamiento y purificación de DNA plasmídico

Dependiendo de la cantidad y grado de pureza requeridos en cada caso, se emplearon diversos métodos de purificación de DNA.

Método A.

Se utilizó el método de lisis alcalina descrito por Maniatis y cols., (1982) ligeramente modificado.

Una colonia, crecida en LB suplementado con ampicilina, se transfería a 3 ml de TB al que se había adicionado el mismo antibiótico y se incubaba a 37°C con agitación, durante una noche. Las células se recogían por centrifugación en microfuga a 12.000 rpm durante 1 minuto y, tras eliminar el medio, se resuspendían en 200 µl de una solución de lisozima al 0,5% en glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, y EDTA 10 mM, y se dejaban lisar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadían 400 µl de una solución de NaOH 0,2 N y SDS al 1% (preparada en el momento a partir de NaOH 5 N y SDS al 10%) y la suspensión se mantenía a temperatura ambiente durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se añadían 300 µl de una solución de acetato potásico 3 M y ácido fórmico 1,8 M; se mezclaba suavemente y se dejaba a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugaba en microfuga a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se precipitaba por incubación después de la adición de 600 µl de isopropanol durante 20 minutos a -20°C. Tras centrifugar como antes, se decantaba el sobrenadante y el precipitado se resuspendía en 400 µl de acetato sódico 2,5 M. Tras 40 minutos de agitación vigorosa se sometía a una nueva centrifugación durante 10 minutos y el sobrenadante se precipitaba después de añadir 250 µl de isopropanol a -20°C durante 20 minutos. Tras una nueva centrifugación el precipitado se lavaba con etanol al 70%, se secaba y se redisolvió en 50 µl de TE.

Método B

Se ha utilizado el sistema de extracción y purificación de DNA comercial "Qiagen", en aquellas situaciones en las que se requería una determinada pureza de DNA (secuenciación).

Se ha empleado este sistema tanto para minipreparaciones (a partir de 3ml de cultivo microbiano) como para maxipreparaciones (extracciones a partir de 500 ml cultivo) de DNA. En ambos casos se siguió el protocolo suministrado por la casa comercial, resuspendiendo finalmente el precipitado en 50 µl (miniprep.) ó 1 ml.(maxiprep.) de H₂O.

7.6 Aislamiento y purificación de DNA genómico a partir de las líneas celulares.

La obtención de DNA genómico a partir de las líneas celulares se realizó utilizando el sistema de purificación en columna "Qiagen cell culture", siguiendo el protocolo suministrado por la casa comercial.

7.7 Determinación del tamaño, pureza y concentración de DNA.

7.7.1 Determinación del tamaño.

Para la determinación del tamaño molecular de DNA lineal se empleaban los fragmentos de restricción obtenidos por digestión del bacteriófago lambda con *Hind*III, cuyos tamaños moleculares son: 23,6; 9,4; 6,6; 4,3; 2,2 y 2,0 Kb.

Una vez determinada la migración de los patrones empleados, se obtenía la recta de regresión, (definida por los logaritmos de la distancia de migración de cada fragmentos y sus tamaños moleculares). A partir de dicha recta se calculaban los tamaños moleculares de los DNAs objeto de estudio, por comparación de la migración con la de los patrones antes citados.

7.7.2 Determinación de la pureza.

La pureza se estimaba midiendo la absorbancia (A) a 280 nm y a 260 nm, y determinando la relación $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$, que para el DNA es de 1,8 - 2,0, y para el RNA es de 2,0 - 2,2.

7.7.3 Determinación de la concentración.

Se determinaba midiendo la absorbancia a 260nm de forma tal que para una densidad óptica de 1, la concentración era de 40 $\mu\text{g/ml}$ para RNA, de 30 $\mu\text{g/ml}$ para oligonucleótidos, y de 50 $\mu\text{g/ml}$ para DNA de doble cadena. Para los cálculos de molaridad de DNA se consideró que 1 pmol de DNA de N Kb equivale a $(0,66 \times N)$ μg de DNA.

7.8 Tratamientos enzimáticos del DNA.

7.8.1 Digestiones con endonucleasas de restricción.

La digestión de DNA con las distintas enzimas de restricción se efectuaba con los tampones recomendados por el fabricante (Boehringer).

Las condiciones de digestión eran las siguientes: en un volumen de 10-40 μ l, se digerían de 10-300 ng/ml de DNA con 1-10 unidades de enzima/ μ g de DNA a 37°C, durante 1-4 horas, cuando la digestión era total. Cuando se realizaba digestión parcial las condiciones se ajustaban de manera que la relación enzima/DNA, oscilara entre 0,05 unidades/ μ g de DNA y 0,5 unidades/ μ g de DNA y se incubaba la reacción durante 5-10 minutos.

En todos los casos la eficiencia de las digestiones se verificaba por electroforesis de las muestras en geles de agarosa.

Si sólo se pretendía analizar el DNA mediante electroforesis, la mezcla de reacción se cargaba directamente en el gel, después de haberle añadido el tampón de muestra. Si se iba a llevar a cabo algún tratamiento posterior, se inactivaba la enzima mediante desproteinización con fenol y fenol/cloroformo según el método habitual, descrito en el apartado 2.9.1. de Materiales y Métodos.

7.9 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Se realizó esencialmente según las técnicas descritas por Davis y cols., (1980).

Soluciones empleadas:

- Tampón de electrodos (TBE)x5:

Tris base 0,45 M
ácido bórico 0,45 M
EDTA 12,5 M, pH 8

- Tampón de muestra x10:

azul de bromofenol 0,1%
sacarosa (P/V) 50%
EDTA 50 mM
SDS 0,01%

- Bromuro de Etidio (EtBr). Se preparaba una solución concentrada (10 mg/ml). Se empleaba a la concentración de 0,5 mg/ml en el tampón TBE x1, con el que se preparaba la solución de agarosa.

- Agarosa (Tipo II): Se empleaban concentraciones entre 0,7-1%, dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA que se querían separar en cada caso.

Procedimiento:

La agarosa se disolvía en tampón TBE x 1 hirviendo unos segundos en horno microondas. Cuando el gel se había enfriado a unos 50°C, se añadía el EtBr. Se solidificaba en bandejas horizontales para electroforesis, dejando pocillos para la colocación de las muestras, mediante el uso de peines de teflón.

Las muestras (10-40 μ l) se preparaban diluyendo, cuando era preciso, la suspensión de DNA en TE y añadiendo un 10% de tampón de muestra. Las electroforesis se llevaban a cabo con el gel sumergido en el tampón TBE x 1. La corriente constante aplicada, era de 10-150 mA según el tamaño del gel. Las bandas de DNA se visualizaban con un transiluminador de luz UV a 254 nm, y se fotografiaban con cámara Polaroid, película polaroid 667 y filtro rojo Kenko R1.

7.10 Extracción de DNA a partir de geles de agarosa.

En muchas ocasiones fue necesario extraer fragmentos de restricción a partir de los geles de agarosa, a fin de subclonarlos en otros vectores. Para ello se hizo uso de la técnica de electroelución de DNA, utilizando el "GeneClean kit". El procedimiento seguido se realizó de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial (BIO 101, La Jolla, California).

7.11 Subclonación de DNA.

La subclonación de los fragmentos de DNA obtenidos por digestión en distintos vectores implicaba: la electroelución de bandas de DNA a partir de los geles de agarosa, y en muchos casos la eliminación del grupo fosfato del extremo 5' del vector (para evitar su recircularización). Finalmente se procedía a la ligación de dichos fragmentos.

7.11.1 Desfosforilación del extremo 5' del DNA.

Se llevaba a cabo por tratamiento del DNA con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP), siguiendo el procedimiento descrito por Maniatis y cols., (1982).

Una vez digerido totalmente el DNA con una enzima de restricción, se extraía con fenol/cloroformo y se precipitaba en las condiciones acostumbradas. El precipitado se redisolvió en un volumen 10 μ l de Tris-HCl 10 mM pH 8, y se añadían 5 μ l de tampón de CIAP x 10 (Tris-HCl 0,5 M, pH 9; MgCl₂ 10 mM; ZnCl₂ 1 mM y espermidina 10 mM). Se añadían 4 U de CIAP y la cantidad necesaria de agua para conseguir un volumen final de 50 μ l. Se incubaba la reacción a 37°C durante 30 minutos. Tras calentar

a 68°C durante 30 minutos, se desproteinizaba dos veces con fenol-cloroformo y 2 veces más con cloroformo. Por último se precipitaba con etanol y acetato sódico en la forma acostumbrada.

7.11.2 Ligación de DNA.

La reacción se realizaba en un volumen final de 10 µl. La mezcla de reacción contenía el vector linearizado, el fragmento de DNA a insertar (en una concentración molar doble o triple que la del vector), el tampón de ligación a una concentración final de (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6; MgCl₂ 10 mM; ATP 1 mM; DTT 1 mM y PEG 8.000 al 5%) y 1-2 unidades Weiss de T4 DNA ligasa. Las condiciones de la reacción eran: 12°C durante 16 horas y 1 unidad de enzima para extremos cohesivos, y 23-26°C durante 4-6 horas y 2 unidades de enzima para extremos romos.

Los productos de la ligación se empleaban para transformar células competentes de *E. coli*, con objeto de amplificar el DNA obtenido.

7.12 Aislamiento de RNA a partir de las líneas celulares:

Para extraer el RNA de las LCLs se utilizó el reactivo comercial de la casa Cinna/Biotech "RNAzol", basado en el método de extracción de RNA publicado por Chomczynski y Sacchi (1987).

Se crecían las células exponencialmente hasta una concentración de 15-30 x10⁶ células, recogiendo éstas y resuspendiéndose en 500 µl de RNAzol (isotiocianato de guanidina, fenol y 2-mercaptoetanol). El homogeneizado se extrajo con cloroformo (1:0,1 vol:vol) y posteriormente la fase acuosa se precipitó con isopropanol, durante 1h a -20°C. El precipitado de RNA se resuspendió en H₂O, previamente tratada con Dietilpirocarbonato.

7.13 Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes de agarosa.

Se llevó a cabo antes de realizar la transferencia a membranas de nylon en los experimentos de hibridación de DNA-RNA. Se siguió el método descrito por Lehrach y cols., (1987).

Soluciones empleadas:

- Tampón de electroforesis:

Tampón MOPS x10: 150 ml
formaldehído: 375 ml
agua bidestilada: 975 ml

El tampón MOPS x 10 está compuesto por ácido morfolinopropanosulfónico 0,2 M, acetato sódico 50 mM y EDTA 5mM.

-Tampón de muestra x10:

glicerol:	50 %
EDTA:	1 mM
azul de bromofenol:	0,4%
xileno cianol:	0,4%

-Solución de formaldehído al 37%.

Procedimiento:

Preparación de las muestras: 20 µg de RNA se resuspendían en 8 µl de agua y se añadían 15 µl de formamida desionizada, 3 µl de tampón MOPS x10 y 5 µl de formaldehído al 37%. A continuación, se calentaban a 60°C durante 10 minutos y se pasaban inmediatamente a hielo durante 2 minutos. Finalmente, se añadían 3-4 µl de tampón de muestra antes de cargar el gel.

Preparación del gel: la bandeja (15x15 cm) y el peine se esterilizaban con agua oxigenada al 30%. Se preparaba la solución de agarosa ultrapura al 1% en 109 ml de agua y se esterilizaba en autoclave durante 15 minutos; se enfriaba a 60°C y se añadían 15 ml de tampón MOPS x10 y 26 ml de formaldehído (en campana de gases).

El tampón de electroforesis alcanzaba el ras del gel pero sin cubrirlo. Se cargaban las muestras y se esperaba a que entraran en el gel, tras lo cual se cubría con tampón. Las condiciones de la carrera eran: 30 voltios, 11mA, hasta que el azul de bromofenol alcanzaba el final del gel.

7.14 Hibridación de ácidos nucleicos.

7.14.1 Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA.

Los fragmentos de DNA de empleados como sondas fueron marcados radiactivamente con (α -³²P) dCTP, por el procedimiento alargamiento del iniciador ("Primer extension").

Método del alargamiento del iniciador ("Primer extensión").

Se basó en la técnica descrita por Feinberg y Vogelstein (1984), utilizando un "kit" suministrado por Amersham International. Consiste en el empleo de una mezcla de hexanucleótidos que, actuando como iniciadores ("primers") en varios sitios de una cadena de DNA desnaturalizado, permiten al fragmento "Klenow" sintetizar la cadena complementaria, introduciendo un oligonucleótido marcado radiactivamente.

Se empleaban unos 25 ng de DNA, que se calentaba a 95-100°C durante 2 minutos. Inmediatamente se ponía en hielo, donde se añadían: 10 µl de la solución (dATP; dGTP; dTTP; Tris-HCl pH 7.8; MgCl₂ y β-mercaptoetanol), 5 µl de la solución (mezcla de hexanucleótidos en agua y BSA), 5 µl de (α-³²P) dCTP (3.000 Ci/mmol), 2 µl de la solución (1unidad/µl del fragmento "Klenow" de la DNA polimerasa I en fosfato potásico 50 mM, pH 6,5; β-mercaptoetanol 10 mM y glicerol al 50%) y agua en cantidad suficiente para alcanzar 50 µl finales de mezcla de reacción. Se incubaba a 20°C durante la noche. Posteriormente se completaba el volumen hasta 100 µl con el tampón con el que se inchara el Sephadex y se pasaba la mezcla por una minicolumna de sephadex G-50.

Preparación de la minicolumna:

Se colocaba en el fondo de una jeringa de 1 ml de capacidad, 0,5 cm de lana de vidrio (previamente tratada con silano-repelente en campana de gases durante 30 minutos y secada en horno a 180°C durante 2 horas); el sephadex G-50 se resuspendía en tampón (NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, SDS 0,1% y Tris-HCl 50 mM pH 7,5) y se dejaba hinchar. Luego se esterilizaba en autoclave y se colocaba el gel en la columna, evitando la formación de burbujas de aire. Se centrifugaba dos veces en las mismas condiciones, añadiéndose 100 µl de tampón entre las dos centrifugaciones.

Finalmente se desnaturalizaba el DNA calentando a 95-100°C, durante 2 minutos en baño de agua hirviendo y pasándolo inmediatamente a hielo.

7.14.2 Hibridación DNA-RNA ("Northern blot"):

Consiste en la transferencia de RNA total o mensajero, separado electroforéticamente por tamaños, a filtros de nylon, para proceder a su hibridación con sondas radiactivas.

Soluciones:

- SSC x 20 : NaCl 3 M y citrato sódico 0,3 M, pH 7.
- Solución Denhardt x 100; Ficoll al 2% (P/V); PVP al 2%(p/v) y BSA al 2% (p/v).
- Solución de prehibridación: solución Denhardt x 5; SSC x 5; Na₂PO₄ 50 mM pH 6,5; SDS al 0,1%; DNA de esperma de salmón 250 mg/ml y formamida al 50% (vol/vol).
- Solución de lavado nº 1: SSC x 2 y SDS 0,1% (p/v).
- Solución de lavado nº 2: SSC x 0,1 y SDS 0,1% (p/v).

7.14.3 Transferencia del RNA a la membrana.

La electroforesis de RNA se realizaba como se describe en el apartado 2.9.8 de Métodos.

Terminada la electroforesis, el gel se agitaba en SSCx20 durante 30 minutos. Seguidamente se apilaban servilletas de papel (de tamaño algo superior al del gel) hasta una altura de 10 cm. Sobre ellas se colocaban 2 papeles Whatman 3 MM (del tamaño del gel), humedecidos en SSC y una membrana de nylon (del tamaño del gel) y humedecida en SSC. Sobre esta membrana se colocaba el gel, evitando la formación de burbujas de aire. La transferencia se realizó bidireccional unas veces y unidireccional otras. En el primer caso sobre el gel se colocaba otra membrana de nylon, 2 papeles Whatman y servilletas, de la misma forma que antes pero en sentido inverso y sobre ello un peso uniformemente repartido de unos 0,5 Kg. Tras unas 16 horas, se sacaban las membranas y se dejaban 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se secaban en horno a 80°C durante 2 horas. Una vez secas se mantenían en bolsas de plástico con desecador de silicagel y selladas.

Con el fin de tener una referencia de tamaños moleculares y para verificar que el RNA se había transferido, se teñía la tira de membrana que contenía el patrón, para lo cual se fijaba el RNA con una solución de ácido acético 1 M durante 10 minutos y a continuación se teñía con una solución de azul de metileno al 0,2%, ácido acético 0,4 M y acetato sódico 0,4 M durante 10 minutos. Finalmente, se lavaba con agua hasta que desaparecía el color azul del fondo.

7.14.4 Hibridación de la sonda radiactiva.

Con el fin de desnaturalizar el DNA no homólogo, se calentaba la solución de prehibridación a 95°C durante 10 minutos y se enfriaba en hielo. En una bolsa de plástico que contenía la membrana, se añadía dicha solución a razón de 4 ml/100 cm² de membrana. Se sellaba la bolsa evitando la formación de burbujas de aire, y se introducía en otra bolsa que se sellaba igualmente. Se incubaba en baño a 42°C durante 1 hora con agitación suave. Pasado este tiempo, se eliminaba la solución de prehibridación y se añadía la solución de hibridación (preparada recientemente), a razón de 2 ml/100 cm² de membrana. La solución de hibridación se preparaba añadiendo a la solución de prehibridación la sonda radiactiva, de modo que la concentración final no excediera 10⁶ cpm/ml.

El sellado de las dos bolsas se realizaba de igual manera que en la prehibridación. Se incubaba en baño a 42°C durante una noche con agitación suave. Tras esto, se sacaba la membrana de las bolsas y se introducía en un baño, con 250 ml/100 cm² de membrana, de solución de lavado nº 1. Se incubaba con fuerte agitación (200 rpm) a temperatura ambiente durante 5 minutos. Este lavado se repetía 3 veces. A continuación se aplicaba la solución de lavado nº 2, con la que se realizaban dos lavados

de 15 minutos a 50°C. Por último la membrana se secaba y se exponía con película para autorradiografía a -80°C con pantallas amplificadoras.

7.15 Secuenciación del DNA.

Para la secuenciación del DNA se siguió el procedimiento diseñado por Sanger y cols., (1977), basado en el empleo de 2',3'-dideoxinucleótidos (ddNTP). Se llevó a cabo en un secuenciador automático ALF (Pharmacia), utilizando, para llevar a cabo las reacciones de secuencia, el "Autoread sequencing kit", suministrado por dicha casa comercial, que utiliza T7 DNA polimerasa. Se secuenciaron muestras de doble cadena, obtenidas mediante lisis alcalina seguida de purificación en las columnas Qiagen, utilizando dos oligonucleótidos: "reverso" y "universal", ambos marcados con fluoresceína.

7.16 Obtención de cDNA total y amplificación específica mediante PCR:

7.16.1. Obtención de cDNA

A partir de 1 mg de RNA total, se sintetizó el cDNA total, mediante la reacción de la transcriptasa reversa. La reacción se llevó a cabo añadiendo a cada mg de RNA previamente calentado a 60°C durante 10 min y enfriado posteriormente en hielo, 1mM de cada dNTP, 5mM Cl₂Mg, 2,5 mM de hexámeros y 2,5 U de transcriptasa reversa (Cetus Corporation, Emeryville, CA). El tampón de reacción fué 50 mM ClK, 10 mM Tris-ClH pH.8, llevándose ésta a cabo a una temperatura de 42°C durante 45 minutos.

7.16.2. PCR

La reacción de síntesis de cDNA se calentó a 70°C durante 10 minutos para inactivar la transcriptasa reversa. A continuación se añadieron 0,15 mM de los oligonucleótido correspondientes y 2,5 U de Taq polimerasa, completando el volumen hasta 100 µl con tampón de PCR (50 mM ClK, 10 mM Tris-ClH pH 8). La reacción de amplificación en cadena ("PCR") se llevó a cabo en las siguientes condiciones: Desnaturalización, 95°C -1 minuto.; Anillamiento, 55°C -1 minuto.; Extensión 72°C -30 segundos, durante 25 ciclos, para acabar finalmente con una extensión de 10 minutos a 72°C.

Las amplificaciones a partir del DNA genómico se llevaban a cabo a partir de 1µg de DNA, previamente sonicado, utilizando 35 ciclos con las características descritas anteriormente.

La reacción se extrajo una vez con fenol:cloroformo, y posteriormente con cloroformo y se cargaron 5 ml de la reacción en un gel de agarosa con el fin de ver si se había amplificado el fragmento. El resto de la reacción se precipitó con 1/10 vol. AcNa 3M y 2 vol.de etanol, resuspendiéndose finalmente en 20 ml de agua, después de lavar el precipitado con etanol 70%.

7.16.3 Diseño de los oligonucleótidos:

Una vez diseñados los oligonucleótidos para introducir las distintas mutaciones puntuales, la secuencia de cada uno de ellos fue comparada mediante un programa informático con la secuencia del cDNA de DPB1*02012 y con la secuencia del plásmido utilizado para la mutagénesis con el fin de detectar posibles hibridaciones inespecíficas en dichas secuencias.

7.16.4 Fosforilación de los oligonucleótidos:

La fosforilación se llevó a cabo 37°C durante 45 minutos añadiendo a 200 pmol de oligonucleótido, 3 ml de 1M Tris.ClH.pH8, 1,5 ml de Cl_2Mg 0.2M, 1,5 ml de 100 mM DTT, 13 ml de 1mM ATP y 4,5 U de T4 polinucleótido kinasa. La reacción de fosforilación se paraba calentando a 65°C durante 10 minutos. El oligonucleótido fosforilado se diluía con TE a una concentración de 6 pmol/ml.

7.16.5 Anillamiento del oligonucleótido fosforilado :

A 200 ng de DNA de cadena sencilla uracilado se le añadían 3 pmol. del oligonucleótido mutante y se llevaba a cabo el anillamiento en un volumen total de 10 ml de tampón: 20 mM Tris ClH pH 7,4, 2 mM Cl_2Mg , 50 mM de CNa. La relación oligonucleótido:molde era de 20-30:1. La reacción se incubó durante 10 minutos a 70°C, dejándose enfriar hasta 30°C durante 30 minutos. Finalmente la mezcla de reacción se paso a hielo.

IV. ANTECEDENTES

4.1 ANTECEDENTES DEL TRABAJO

La línea de investigación que se lleva a cabo en nuestro laboratorio se centra en el estudio de la regulación de la expresión de las moléculas del MHC de clase II y de los procesos de procesamiento y presentación de Ag, mediados por estas moléculas. Como se ha visto en la Introducción, estas funciones son vitales para el mantenimiento de la coordinación del Sistema Inmune y para la respuesta frente a agentes patógenos.

Para desarrollar esta investigación, se han generado líneas celulares mutantes defectivas en la expresión de HLA-DP, uno de los locus del MHC de clase II, del que menos se conoce, tanto su función como su regulación. Estas líneas mutantes provienen de una línea parental denominada 721, cedida por el Dr. DeMars, que expresa los alelos HLA-DPw2 y -DPw4. A partir de esta línea, mediante mutagénesis por ICR191 y selección por CTLs DPw2 específicos, se obtuvieron clones que resistían la lisis inducida por estos CTLs, pero que lisaban en presencia de CTLs DPw4 específicos. Estas líneas se denominaron 721.EM1, 721.EM2, 721.EM5 y 721.EM6. El fenotipaje de estas líneas mediante el AcM DPw2 específico ILR1, mostró que expresaban en superficie moléculas para DPw2, excepto 721.EM6 que era negativa para este Ac (Figura 15).

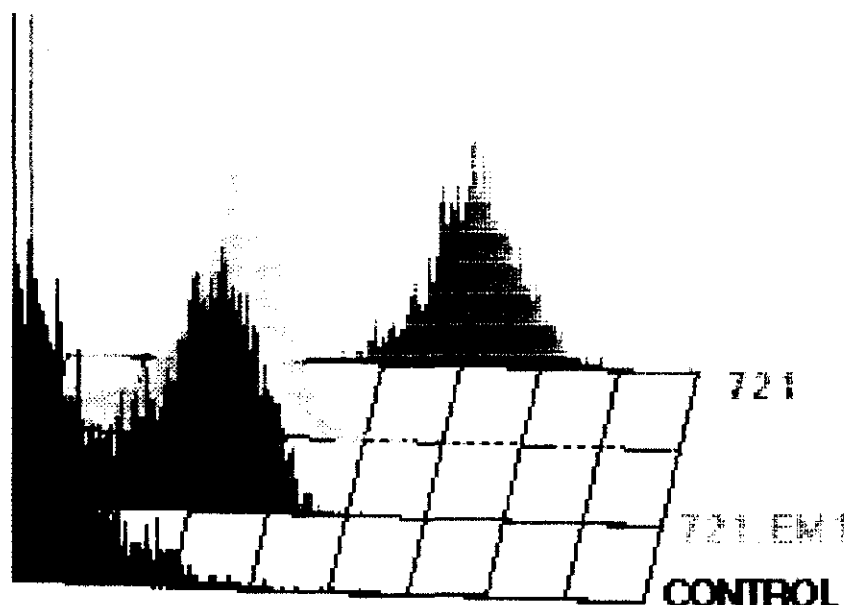


Figura 15.-Tinción de las líneas diploides mutantes 721.EM1, 721.EM2 y de la línea parental 721, con el AcM ILR1 específico para DPw2. En abcisas se representa la intensidad de fluorescencia y en ordenadas el número relativo de células. Se puede observar la disminución de la expresión del alelo DPw2 en las líneas mutantes respecto de la línea parental 721

La importancia de estas líneas mutantes obtenidas radica en que al ser detectadas por anticuerpos anti-DPw2, pero no ser lisadas por los clones citotóxicos DPw2 específicos, estamos en presencia de moléculas no funcionales de DPw2, porque no son capaces de activar a los CTLs, pero que conservan los epítomos reconocidos por anticuerpos anti-DPw2.

Un estudio más pormenorizado de la expresión en superficie de las moléculas de HLA-DPw2 por parte de estos mutantes, mostró que las líneas 721.EM1 y 721.EM2, aunque expresaban moléculas de DPw2 en superficie, lo hacían siempre en menor medida, alrededor de un 30%, que la línea parental 721 (Fig 15 y Tabla I).

Por el contrario, 721.EM5 expresa DPw2 con niveles semejantes a 721 (Tabla I). Los datos obtenidos por citometría de flujo (CDF) como intensidad media de fluorescencia, se representan en porcentaje respecto de la expresión de 721 y son la media de 5 experimentos.

B7/21	100	98	94	97	93
ILR1	100	35	38	92	4

Tabla 1.-Expresión en superficie de HLA-DPw2 detectada por el AcM ILR1 y CDF. B7/21 es un anticuerpo monomófico para HLA-DP. La expresión de 721 se toma como patrón y la de las otras líneas se refieren a ella en porcentaje.

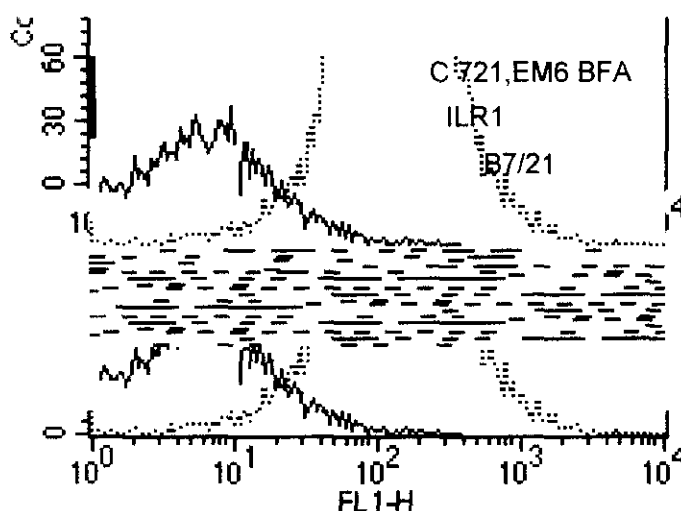
Mediante tinción citoplásmica de la línea 721.EM6 se descubrió que expresaba en citoplasma el dímero $\alpha\beta$ de DPw2. El resultado se muestra en la fig. 16, donde se detecta la expresión de moléculas de HLA-DPw2 en el citoplasma de este mutante después de permeabilizar con BFA (Ver Materiales y Métodos), al teñir con el anticuerpo ILR1.

En un intento de facilitar el análisis de los resultados, se decidió trabajar con líneas haploides para HLA. Para lo cual se obtuvo, también a partir de 721, la línea mutante 45.1, a la que le falta el brazo corto de uno de los cromosomas 6, por lo que sólo expresa un alelo de cada uno de los genes del MHC, es decir, es haploide para HLA. Con respecto al locus DP, esta línea expresa el alelo DPw2.

Por mutagénesis con ICR191 y mediante selección con clones de CTLs DPw2 específicos, se obtuvieron unos mutantes que no lisaban en presencia de estos clones citotóxicos, por lo que se dedujo que eran defectivos en la expresión en superficie de las moléculas de HLA-DPw2. Al provenir de la línea 45.1 eran haploides para los genes del MHC, lo que facilitaba su estudio. El protocolo de mutagénesis utilizado hacía poco probable la presencia de más de una mutación en cada línea celular

obtenida (Sánchez-Pérez y cols., 1984).

Figura 16.- Tinción citoplásmica de la línea 721.EM6 con los AcM ILR1 (anti-DPw2) y B7/21 (anti-DP). Se observa la menor intensidad de la tinción con ILR1, debido a que DPw2 sólo se expresa en citoplasma. En ordenadas se representa el nº relativo de células y en abscisas la intensidad de fluorescencia



Por citometría de flujo se comprobó que no expresaban moléculas de HLA-DP, al ser negativos en la superficie celular para AcMs anti-DP, aunque mantenían la expresión de DR y DQ en los mismos niveles que la línea parental 45.1.(Diez Orejas, 1992). En la tabla II se presentan estos datos.

De alguno de ellos se estudió su expresión de RNAm para las cadenas α y β de las moléculas de HLA-DP, comprobándose que eran defectivos en la expresión de una de las cadenas, excepto 45.EM14 que era defectivo en la expresión de ambas cadenas (Arroyo y cols., 1994).

Las líneas mutantes haploides utilizadas en este estudio han sido: 45.EM1, 45.EM2, 45.EM3, 45.EM5, 45.EM7, 45.EM8, 45.EM9, 45.EM11, 45.EM13, 45.EM14, 45.EM15, 45.EM16, 45.EM18, cuyas características de expresión en superficie se presentan en la Tabla II.

	45.EM1	45.EM2	45.EM3	45.EM5	45.EM7	45.EM8	45.EM9
HLA-DR mb	+	+	+	+	+	+	+
HLA-DQ mb	+	+	+	+	+	+	+
HLA-DP mb	-	-	-	-	-	-	-
HLA-DP cit	-	-	+	-	-	-	-

	45.EM11	45.EM13	45.EM14	45.EM15	45.EM16	45.EM18	45.EM19
HLA-DR mb	+	+	+	+	+	+	+
HLA-DQ mb	+	+	+	+	+	+	+
HLA-DP mb	-	-	-	-	-	-	-
HLA-DP cit	-	-	-	+	-	-	+

Tabla II. - Tinción en superficie (mb) de las LCLs haploides con los AcMs L243 (anti-DR), 33.1 (anti-DQ) y B7/21 (anti-DP), ILR1 (anti-DPw2) y DP11.1 (anti-DPw4) y en citoplasma (cit) con B7/21, ILR1 y DP11.1 y analizados por CDF. +: Positivo; -: Negativo.

En la tabla II también se muestra el resultado de las tinciones citoplásmicas de los mutantes con los AcMs B7/21 (anti-DP), ILR1 (anti-DPw2) y DP11.1. Algunos de estos resultados se comentaran ampliamente con posterioridad.

V. RESULTADOS

5.1. EXPRESIÓN DE RNAm Y SU CUANTIFICACIÓN MEDIANTE DENSITOMETRÍA

Como se describe en los antecedentes a este trabajo, la mayoría de los mutantes haploides de los que disponíamos eran defectivos en la expresión de una de las cadenas de la molécula de HLA-DP. Esto suponía que la mutación había afectado, posiblemente, a factores reguladores de la expresión de los genes que codifican para estas cadenas. Una primera aproximación a este problema era comprobar si existían variaciones en la expresión de las cadenas que se transcribían respecto de la línea parental parental 45.1. Es decir, saber si además de la no transcripción de una de las cadenas, la que se expresaba lo hacía con distinta intensidad que las cadenas de la línea de la que provenían. Para ello se realizó un Northern cuantitativo en el que se incluyeron además, dos líneas celulares que no habían sido caracterizadas con anterioridad: 45.EM3 y 45.EM15.

Los resultados obtenidos en el Northern (Figura 17) ponen de manifiesto la heterogeneidad en la expresión del RNAm de las cadenas $\alpha\beta$ de la molécula de DP de nuestros mutantes.

En el caso de los mutantes no caracterizados previamente, los dos presentaban RNAm para las dos cadenas de DP aunque parece que el mutante 45.EM3 expresa en menor cantidad el RNAm de la cadena β . El resto de los mutantes se comporta igual a lo descrito por Arroyo y cols. (1994). En la tabla III se resume, para todos los mutantes estudiados, su expresión o no de RNAm para las cadenas $\alpha\beta$ de las moléculas de HLA-DP.

	45.EM1	45.EM2	45.EM3	45.EM5	45.EM7	45.EM8	45.EM9
DPA1 RNAm	+	+	+	+	+	+	+
DPB1 RNAm	-	-	+	-	-	-	-
	45.EM11	45.EM13	45.EM14	45.EM15	45.EM16	45.EM18	45.EM19
DPA1 RNAm	-	+	-	+	+	-	+
DPB1 RNAm	+	-	-	+	-	+	+

Tabla III.-Resumen de los resultados del Northern de las LCLs haploides.

+:Presencia del RNAm correspondiente; -:Ausencia del RNAm.

El mutante 45.EM19 se ha incluido en este trabajo al utilizarse como control en otros experimentos. Además, también nos sirve como control en el Northern.

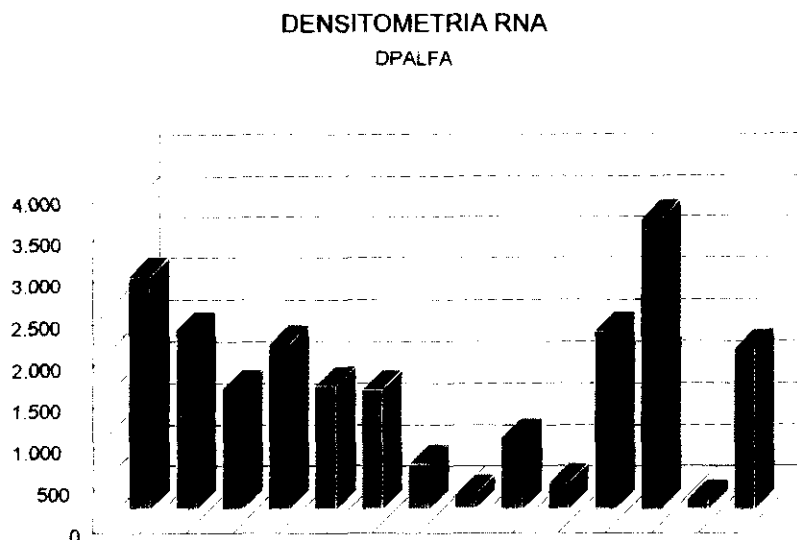
Por lo tanto, con los resultados de los nuevos mutantes incluidos en este estudio, las líneas celulares haploides para MHC, defectivas en la expresión en la superficie celular de las moléculas de HLA-DP, pueden agruparse de la siguiente forma:

- Las que expresan el RNAm para las dos cadenas: 45.EM3, 45.EM15 y 45.EM19.
- Las que sólo expresan el RNAm de la cadena alfa: 45.EM1, 45.EM2, 45.EM5, 45.EM7, 45.EM8, 45.EM9, 45.EM13 y 45.EM16.
- Las que sólo expresan RNAm para la cadena beta: 45.EM11 y 45.EM18.
- Los que no expresan RNAm ni para la cadena alfa ni para la cadena beta: 45.EM14.

El estudio cuantitativo de los niveles de expresión de los RNAm de las líneas mutantes, se realizó mediante el análisis densitométrico de los films obtenidos, utilizando un densitómetro (Material y Métodos). Se obtuvieron las densidades relativas de las señales debidas a las hibridaciones específicas de las sondas de DPA*0103 y de DP*02012, en cada uno de los casos. También se analizaron los films provenientes de los mismos geles incubados con una sonda para RNA 18S.

Se normalizaron los datos obtenidos de las sondas de DP con los provenientes de la hibridación con la sonda de RNA 18S, de la siguiente forma: la señal proveniente de la línea parental en la hibridación con la

Figura 18.- Análisis densitométrico de los RNAm de las cadenas α de las moléculas de HLA-DPw2 de los mutantes haploides.



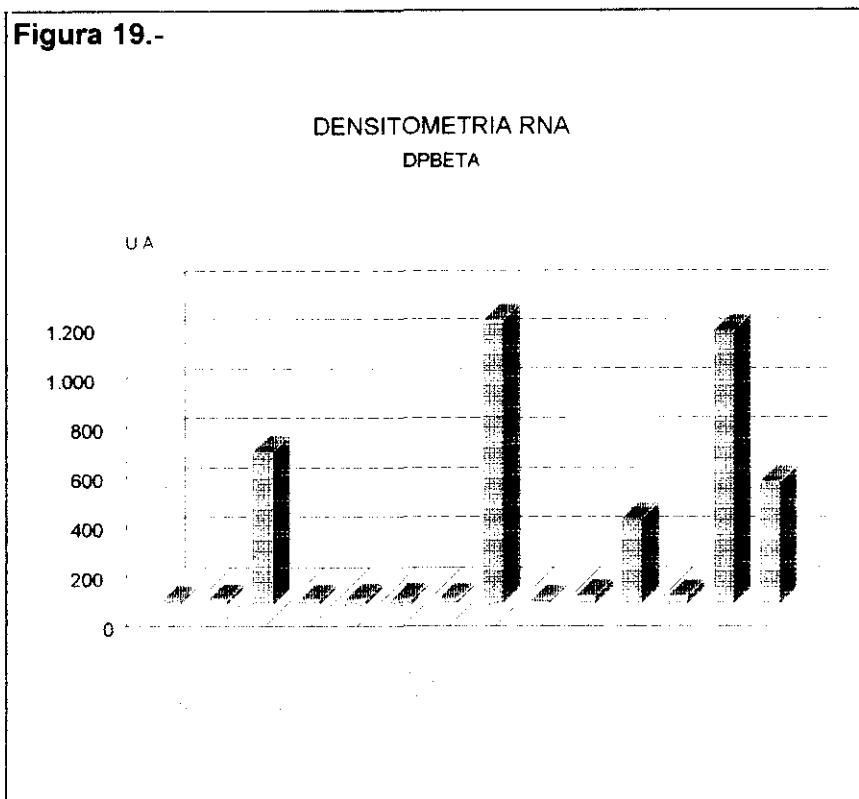
sonda de RNA 18S se tomó como 100 y las de las líneas mutantes se compararon con ésta. Los porcentajes obtenidos se tomaron como referencia al analizar la señal obtenida con las sondas de DPA*0103 y DPB*02012. El valor final se corresponde con el obtenido mediante la fórmula:

$N=D/P$, donde D es el valor obtenido en la densitometría con las sondas de HLA-DPw2 y P el porcentaje de RNAr obtenido al comparar cada línea con la parental.

Los datos normalizados se representan en la Figura 18 para la cadena α y en la Figura 19 para la cadena β . En la Tabla IV se presentan las diferencias de expresión de los RNAm para la cadena α y la cadena β de los mutantes, comparadas con la expresión de las mismas en 45.1. Se muestran resultados característicos de uno de los tres experimentos realizados.

Como se puede observar en la figura 18, con respecto a la expresión de la cadena α , existen diversos comportamientos. Algunos mutantes la expresan en mayor cantidad que la línea parental 45.1 (**45.EM1 y 45.EM16**), otros lo hacen de manera similar (**45.EM2, 45.EM5 y 45.EM15**), y otros lo hacen en menor cantidad (**45.EM3, 45.EM7, 45.EM8, 45.EM9 y 45.EM13**) (Tabla IV). Por último, otros no expresan la cadena α (**45.EM11, 45.EM14 y 45.EM18**).

En el caso de la cadena β , los resultados no son tan variados, al existir menor número de mutantes que expresen esta cadena. En la figura 19



podemos observar cómo es la expresión en cada caso, después de normalizar con el RNAr, siguiendo el proceso antes mencionado.

Como en el caso de la cadena α , podemos observar que existen mutantes que expresan RNAm para la cadena β de HLA-DP en mayor cantidad que la línea parental 45.1 (**45.EM11, 45.EM3 y 45.EM18**), y otro que la expresa en menor proporción (**45.EM15**) (Tabla IV). Además, están los que no expresan la cadena β que son la mayoría de las líneas celulares mutantes (**45.EM1, 45.EM2, 45.EM5, 45.EM7, 45.EM8, 45.EM9, 45.EM13, 45.EM14 y 45.EM16**). Las líneas celulares mutantes que sólo expresan RNAm para la cadena β , la sobre-expresan de dos a tres veces comparado con la línea parental, mientras que para la cadena α , no ocurre lo mismo.

	45.EM1	45.EM2	45.EM3	45.EM5	45.EM7	45.EM8	45.EM9
DPA1 RNAm	1.44	1.11	0.75	1.02	0.71	0.70	0.3
DPB1 RNAm	-	-	1.24	-	-	-	-
	45.EM11	45.EM13	45.EM14	45.EM15	45.EM16	45.EM18	
DPA1 RNAm	-	0.4	-	1.1	1.8	-	
DPB1 RNAm	2.3	-	-	0.7	-	2.93	

Tabla IV.-Datos cuantitativos de las diferencias en expresión de los RNAm para las cadenas α y β de HLA-DPw2, de los mutantes haploides. Los datos se expresan en tanto por 1. Se muestra un experimento representativo de los tres realizados.

Por lo tanto, después del análisis de los resultados densitométricos, podemos concluir que 45.EM1, 45.EM2, 45.EM5 y 45.EM16 sólo expresan la cadena α pero en mayor cantidad que la línea parental. 45.EM3 expresa las dos cadenas, aunque la α en menor cantidad que 45.1 y la β igual. 45.EM15 también expresa las dos cadenas pero el patrón es diferente: la α en igual proporción que la línea parental y la β en menor. 45.EM7 y 45.EM8 expresan sólo la cadena alfa y las dos en menor cantidad que la línea parental. 45.EM13 expresa sólo la cadena α pero un poco menos de la mitad que la expresión de la misma cadena de 45.1. En el caso de 45.EM9 la disminución es más acusada. 45.EM11 y 45.EM18 expresan sólo la cadena β , aumentada en los dos casos. Mientras que 45.EM18 lo hace en una cantidad que casi triplica la expresada por la línea parental, 45.EM11 la duplica. Por último 45.EM14 no expresa ninguna de las dos cadenas.

5.2.EFECTO DEL IFN- γ SOBRE LA EXPRESIÓN DE CLASE II DE LAS LÍNEAS CELULARES MUTANTES

Los resultados obtenidos hasta el momento indicaban que nuestros mutantes no expresaban constitutivamente las moléculas de HLA-DP, pero no indicaban si eran capaces de recuperar su expresión en presencia de determinadas citoquinas. Podría ocurrir que los defectos de expresión de una de las cadenas que observamos en el Northern fuese debido a un factor que no se sintetizase en condiciones normales, pero que por el efecto inductor de las citoquinas sí. Además, queríamos seguir el efecto de las citoquinas elegidas en la expresión de las otras moléculas de clase II.

Para estudiar si las citoquinas podían tener algún efecto sobre la no expresión de moléculas de HLA-DP por parte de las LCLs a estudio y si podía estar afectada alguna vía de regulación de clase II en general, utilizamos las dos citoquinas que más influyen en la expresión de clase II en linfocitos B, el interferón- γ (IFN- γ) y la interleuquina 4 (IL-4), la primera disminuyendo la expresión y la segunda aumentándola (Glimcher y Kara, 1992).

Para ello y según se describe en Materiales y Métodos, se incubaron las células con las citoquinas y al cabo de 24 horas se recogían células de cada tratamiento, se teñían con AcM anti-DP, anti-DR y anti-DQ, y se analizaban por citometría de flujo obteniéndose la intensidad media de fluorescencia para cada anticuerpo (L243, B7/21 y 33.1, respectivamente).. A las 48 horas se repetía la operación. Se ponía especial cuidado en utilizar siempre la misma cantidad de células para la misma cantidad de anticuerpo, para no tener variaciones debidas al protocolo. Lo que se esperaban eran variaciones en el número de moléculas en la superficie celular por lo que se estudiaba eran las diferencias en la intensidad media de fluorescencia en cada caso.

En el caso de las líneas mutantes deficientes en la expresión de HLA-DP, también se observó la posible existencia de células que recobrasen esta expresión, siguiendo el número de células negativas y positivas con cada anticuerpo. Nunca hubo variaciones en este parámetro. Se utilizaron como controles de expresión de HLA-DP las LCLs 45.1 (DPw2) y 127 (DPw4). Como control positivo del efecto del IFN- γ se utilizó la línea tumoral HeLa, que no expresa constitutivamente clase II, pero sí lo hace en presencia de

IFN- γ . Para observar el posible efecto de las citoquinas sobre el otro alelo de HLA-DP, utilizamos la línea mutante 721.EM6 que sólo expresa DP4 y es diploide para los genes de clase II.

Los resultados indican que las líneas celulares tienen comportamientos diferentes ante la presencia de IFN- γ e IL-4 en el medio de cultivo.

Ninguna de las líneas celulares mutantes defectivos en la expresión de HLA-DP estudiados, recupera esta expresión por acción del IFN- γ , ni de la IL-4, ni de los dos juntos. Sin embargo, las células controles si se comportaron de acuerdo a lo descrito para estas citoquinas. HeLa expresó bajos niveles de HLA-DP y -DR, pero no -DQ a las 24h de incubación. 45.1 aumentó los niveles de expresión de todas las moléculas de clase II durante el tratamiento con IL-4. La línea mutante 127 que expresa el alelo DPw4 pero no el DPw2, tampoco recupera la expresión de este último.

Por lo tanto, al no recuperar la expresión de HLA-DP las líneas celulares mutantes estudiadas en este trabajo, los factores y/o secuencias reguladoras afectados no responden a la inducción con citoquinas, por lo que deben estar implicados en los mecanismos de modulación inducidos por las citoquinas empleadas.

5.3.PRODUCCIÓN DE HÍBRIDOS SOMÁTICOS

Del análisis de los resultados obtenidos hasta ahora, (la mayoría de los mutantes eran defectivos en la expresión de una de las cadenas de la molécula de HLA-DP y la incubación con IFN- γ y con IL-4, no provocaba la recuperación del fenotipo parental) dedujimos que teníamos unos mutantes que estaban afectados en la regulación de la expresión de alguna/s cadena/s de la molécula de HLA-DP. Podían tener alterado algún factor que regulase la transcripción, o presentar algún defecto en las secuencias del genoma que regulasen la expresión de los genes de las cadenas α y β de la molécula de DP. Para poder estudiar esta posibilidad en todos los mutantes, decidimos fusionarlos con una línea carente de los genes de clase II y comprobar si recuperaban la expresión de DP. La recuperación de la expresión de DP, significaría que la mutación que poseen está afectando a algún factor de regulación que actuase en *trans*, y que sería aportado por la línea celular clase II- (180). Si no recobran, la expresión significaría que pueden estar afectados en *cis*, es decir, que la mutación esté afectando al gen estructural o a alguna secuencia promotora o reguladora del mismo. La línea utilizada para las fusiones, es una línea que carece del brazo corto de uno de los cromosomas 6 y presenta una delección en el otro, por lo que no posee ningún gen estructural de las moléculas del MHC, aunque si presenta los factores reguladores.

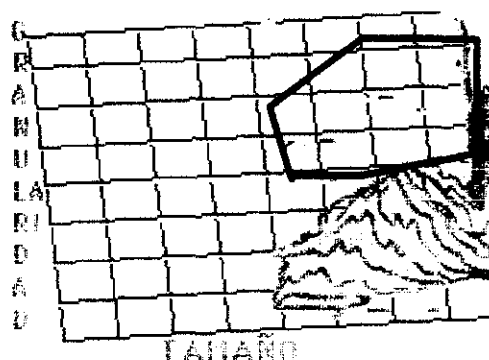
La técnica de las fusiones somáticas ha sido utilizada por Bénichou y Strominger (1991), Stimac y cols. (1991), Seidl y cols. (1992), Lisowska-Groszpiere y cols (1994), etc., para estudiar líneas celulares mutantes o provenientes de pacientes que no expresaban moléculas de clase II, pertenecientes a uno de los loci o a los tres. La detección de la posible expresión de clase II después de la generación de los híbridos somáticos, se realiza a las 48h para evitar



Figura 18.-Imagen confocal de un híbrido somático con los dos núcleos señalados.

que se produzcan los procesos de fusión nuclear y exclusión cromosómica, normales en una fusión (Figura 18). Esto podría ocasionar la pérdida de los genes estructurales y enmascarar posibles resultados positivos debidos a la acción en los híbridos de los factores *trans* aportados por la fusión, y no a la falta de algún factor de regulación (Bénichou & Strominger, 1991). La detección de los híbridos positivos se realizaba, en los trabajos citados anteriormente, por microscopía óptica, con el criterio de que en cuanto existiese uno positivo la fusión era considerada positiva. Nosotros hemos aplicado la CDF para la detección y cuantificación de los híbridos positivos, aumentando el número de células analizadas (una media de 20.000 por muestra).

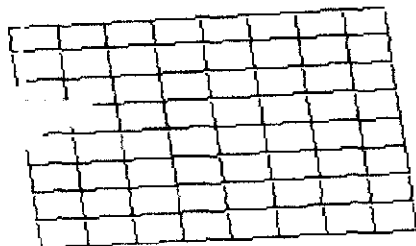
Figura 19. Representación del tamaño y de la granularidad de una fusión tipo. Mayoritariamente los híbridos caen en la zona de complejidad intermedia y tamaño mediano-grande delimitada en la región azul. Esto se determinó por separación por CDF y posterior análisis.



Por otra parte, debido a las características citométricas de los híbridos fusionados (mayor granularidad y, a veces, mayor tamaño) (Figura 19), hemos podido calcular los % de positividad respecto de los híbridos fusionados y no sólo respecto de la población total (Ver Materiales y Métodos). En este último caso, los porcentajes pueden parecer poco significativos, pero cuando se comparan con los % de híbridos, se aprecia claramente la positividad o negatividad de la fusión.

Realizando estos cálculos con los controles (fusiones teñidas sólo con segundo anticuerpo RAM-FITC), aparece en los híbridos una señal de positividad inespecífica debida al 2º anticuerpo entre el 2-3%. Por lo tanto, hemos considerado fusiones positivas, sólo, las que superaban el 5% de híbridos positivos (Tabla V).

B/L 45.EM2*45.EM1



B/L 45.EM9*45.EM5

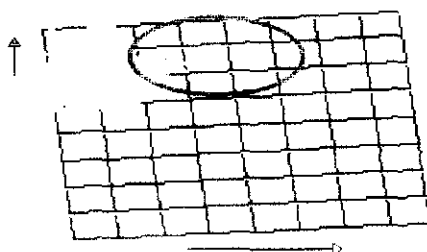


Figura 20.-Representación tridimensional de la señal de fluorescencia para HLA-DR y HLA-DP en una fusión que produce híbridos que no recuperan la expresión de DP (45.EM2*45.EM1). Todas las células son HLA-DR positivas pero no expresan dímeros de HLA-DP.

Figura 21.- Idem a la anterior pero de una fusión que produce híbridos que expresan en superficie DP (45.EM9*45.EM5). La zona de híbridos doble positivos se delimita por una región roja.

Para mayor seguridad y como verificación última, todas las fusiones eran recomprobadas por microscopía óptica de fluorescencia. Como otra medida de control, en el caso de que se viese afectada de manera inespecífica, la expresión de HLA-DR por la fusión, hemos realizado dobles tinciones con AcM anti-DR y anti-DP (Ver Materiales y Métodos).

FUSIÓN	% híbridos +	%híbridos totales	RESULTADOS (%)
180 x 45.EM1	5,04+	10,2	49,4
180 x 45.EM2	3,79+	5,23	72,4
180 x 45.EM3	1,95+	8,12	24,0
180 x 45.EM5	5,68+	15,01	37,9
180 x 45.EM7	0,40-	13,2	3,0
180 x 45.EM8	0,60-	15,8	3,7
180 x 45.EM9	4,42+	14,3	30,9
180 x 45.EM11	0,30-	10,3	2,9
180 x 45.EM13	12,36+	15,9	77,7
180 x 45.EM14	0,23-	8,3	2,7
180 x 45.EM15	0,25-	8,23	3,0
180 x 45.EM16	0,19+	3,3	5,7
180 x 45.EM18	14,97+	16,9	88,0
180 x SJO	2,99-	14,1	21,2
127 x 45.EM1	2,69+	8,1	33,2
127 x 45.EM2	0,81+	2,3	35,2
127 x 45.EM5	1,52+	3,01	50,6
127 x 45.EM7	0,33-	8,3	3,9
127 x 45.EM8	0,26-	6,3	4,1
127 x 45.EM9	0,56+	8,1	6,9
127 x 45.EM11	0,30-	10,9	2,7
127 x 45.EM14	0,18-	8,4	2,1
127 x 45.EM15	14,9+	18,6	80,0
127 x 45.EM18	1,14+	3,01	37,8
SJO x 45.EM1	3,94+	9,6	41,0
SJO x 45.EM2	2,52+	5,2	48,4
SJO x 45.EM3	8,64+	12,6	68,5
SJO x 45.EM5	4,26+	15,2	28,0
SJO x 45.EM7	0,19+	3,0	6,6
SJO x 45.EM8	2,93+	8,2	35,7
SJO x 45.EM9	0,18-	5,6	3,2
SJO x 45.EM11	0,63-	2,4	26,2
SJO x 45.EM14	9,44+	15,2	62,1
SJO x 45.EM15	1,52+	4,2	36,1
45.EM1 x 45.EM2	0,28-	7,1	3,9
45.EM1 x 45.EM5	0,39-	8,5	4,5
45.EM1 x 45.EM9	1,54+	4,3	35,8
45.EM1 x 45.EM13	2,74+	4,7	58,2
45.EM1 x 45.EM16	1,48+	3,6	41,1
45.EM1 x 45.EM18	4,44+	6,9	64,3
45.EM2 x 45.EM5	0,60-	12,1	4,9
45.EM2 x 45.EM9	1,97+	6,2	31,7
45.EM2 x 45.EM13	3,13+	8,1	38,6
45.EM2 x 45.EM16	3,55+	14,6	24,3
45.EM2 x 45.EM18	1,63+	6,1	26,7
45.EM3 x 45.EM5	4,94+	8,9	55,5
45.EM5 x 45.EM9	0,44+	2,8	15,7
45.EM5 x 45.EM13	0,77+	2,0	38,5
45.EM5 x 45.EM16	1,96+	4,7	41,7
45.EM5 x 45.EM18	2,11+	9,8	21,5
45.EM9 x 45.EM13	0,87+	2,0	43,5

45.EM9 x 45.EM16	3,65+	8.1	45,0
45.EM9 x 45.EM18	11,23+	15.8	71,0
45.EM13 x 45.EM16	8,65+	14.8	58,4
45.EM13 x 45.EM18	6,86+	14.2	48,3
45.EM16 x 45.EM18	3,63+	12.4	29,2

Tabla V.- Resultados cuantitativos de todas las fusiones realizadas en este trabajo. La obtención de los porcentajes se explica en el texto. En la primera columna se muestra el porcentaje de híbridos positivos. En la segunda columna se presenta el porcentaje de híbridos totales obtenidos. La tercera columna muestra el resultado definitivo con la consideración de positividad (+) o negatividad (-), dependiendo del %. Se presentan las medias provenientes de los datos de 3 a 5 fusiones, según los casos.

El primer objetivo que nos planteamos fue descubrir cuáles de nuestros mutantes estaban afectados en *cis* y cuáles en *trans*. Para ello fusionamos todas las líneas mutantes estudiadas con la línea 180. Los resultados de las fusiones se resumen en la tabla VI.

	45.EM1	45.EM2	45.EM3	45.EM5	45.EM7	45.EM8	45.EM9
180	+	+	+	+	-	-	+

	45.EM11	45.EM13	45.EM14	45.EM15	45.EM16	45.EM18
180	-	+	-	-	+	+

Tabla VI. Resultado de las fusiones de las líneas celulares mutantes y la línea celular 180 que no posee los genes de clase II. +: Recupera la expresión en superficie de DP. -: No la recupera. Los resultados son media de 3 a 5 fusiones en cada caso.

De lo reflejado en la tabla podemos dividir nuestros mutantes en dos grupos, según su comportamiento al formar híbridos somáticos con la línea celular 180:

-Recuperan la expresión de HLA-DP en superficie: 45.EM1, 45.EM2, 45.EM3, 45.EM5, 45.EM9, 45.EM13, 45.EM16, 45.EM18.

-No recuperan la expresión de HLA-DP: 45.EM7, 45.EM8, 45.EM11, 45.EM14, 45.EM15.

5.4. MUTANTES QUE RECUPERAN LA EXPRESIÓN DE HLA-DP

La expresión de moléculas de HLA-DP en superficie después de fusionar con 180, implica la ausencia de mutación en la secuencias en *cis*, tanto de los ORFs como de las secuencias reguladoras. Es decir, que el fallo estaría en algún factor de regulación de la transcripción que actúe en *trans*.

Compaginando estos resultados con los obtenidos en el Northern, podemos ver que el posible factor regulador implicado es específico de cadena (excepto en caso del 45.EM3). En todos los mutantes haploides el posible factor afectado es determinante para la transcripción del gen de la cadena β , menos en el caso del 45.EM18, que estaría alterado para el gen de la cadena α .

Para comprobar si el factor regulador de la transcripción afectado era el mismo en todos los casos, fusionamos todos y cada uno de los mutantes que eran positivos con 180 entre sí. Si el factor fuese el mismo las fusiones serían negativas. En el caso de que fuesen distintos, las fusiones serían positivas, al complementarse los mutantes entre sí. Esto nos permitiría adscribir las líneas celulares mutantes a distintos grupos de complementación que definirían distintos factores que controlen la expresión de HLA-DP.

	45.EM 1	45.EM 2	45.EM 3	45.EM 5	45.EM 9	45.EM1 3	45.EM 16	45.EM 18
45.EM 1		-	+	-	+	+	+	+
45.EM 2			+	-	+	+	+	+
45.EM 3				+	+	+	+	+
45.EM 5					+	+	+	+
45.EM 9						+	+	+
45.EM 13							+	+
45.EM 16								+
45.EM 18								

Tabla VII.- Resultados de las fusiones entre los mutantes que recuperan la expresión de HLA-DP con 180. +:Recupera la expresión en superficie de DP. -:No la recupera. De 3 a 5 fusiones en cada caso.

Los resultados obtenidos, que se muestran en la tabla VII, nos permitieron comprobar que al fusionar 45.EM1, 45.EM2 y 45.EM5 entre sí, no se recupera la expresión de DP en ninguna de las combinaciones. Sin embargo, al realizar las fusiones de cualquiera de estas líneas celulares con otros mutantes sí se recuperaba la expresión. Las fusiones entre las demás líneas entre sí no produjeron ningún resultado negativo.

Por lo tanto, habíamos definido 5 factores reguladores de la expresión de la cadena β y uno de la cadena α afectados en nuestros mutantes.

45.EM1, 45.EM2 y 45.EM5 constituyen un grupo de complementación al no ser capaces de recuperar la expresión de DP al fusionarse entre sí. Por lo tanto, los tres deben tener afectado el mismo factor de regulación. 45.EM3 constituye un caso especial, ya que presenta RNAm para las dos cadenas, más adelante estudiaremos con detalle este mutante.

45.EM9, 45.EM13 y 45.EM16 tienen afectados, según los resultados obtenidos, diferentes factores de regulación de la cadena β , mientras que 45.EM18 debe estar afectado en un factor específico de la cadena α de DP.

En la bibliografía existen datos de otras líneas defectivas en la expresión de clase II, que han sido fusionadas entre sí y, según los resultados obtenidos, clasificadas en 4 grupos de complementación (Seidl y cols., 1992, Acolla y cols., 1995). Las posibilidades de que nuestras líneas mutantes perteneciesen al mismo grupo de complementación que alguna de estas líneas eran pocas, ya que nuestros mutantes presentan deficiencias específicas de isotipo de molécula de clase II, mientras que las líneas mencionadas anteriormente, eran defectivas en expresión de todas las moléculas de clase II.

Aún así, decidimos comprobar esta posibilidad y fusionamos nuestros mutantes en *trans* con una de estas líneas, SJO, amablemente cedida por el Dr.J Gorski. Esta línea proviene de un paciente con inmunodeficiencia congénita debida a la no expresión de las moléculas de clase II. Originariamente, no expresaba tampoco moléculas de clase I, pero al immortalizarla se indujeron espontáneamente estos antígenos (Bénichou & Strominger, 1991, Seidl y cols., 1992).. SJO ha sido descrita como defectiva en una proteína que se une al promotor de la cadena alfa de DR (y de las otras moléculas de clase II) (Stimac y cols., 1991).

Los resultados obtenidos de las fusiones entre nuestras líneas mutantes y SJO se muestran en la tabla VIII.

	45.EM1	45.EM2	45.EM3	45.EM5	45.EM9	45.EM13	45.EM16	45.EM18
SJO	+	+	+	+	-	+	+	+

Tabla VIII.- +:Recupera la expresión en superficie de DP. -:No la recupera.

De 3 a 5 fusiones en cada caso.

Como podemos comprobar en la tabla VIII, sólo una línea celular es negativa para HLA-DP en superficie al fusionarla con SJO, 45.EM9. Por lo tanto, podemos deducir de este resultado que las dos líneas pertenecen al mismo grupo de complementación, es decir, que presentan el mismo factor regulador de la transcripción afectado.

5.5.MUTANTES QUE NO RECUPERAN LA EXPRESIÓN DE HLA-DP

En el caso de los mutantes que no recuperan la expresión de DP al fusionarlos con 180, el fallo radicaría en alguna secuencia génica situada en *cis* respecto del ORF, o en el mismo ORF. Pero antes de seguir adelante debíamos estar seguros de que el gen que codifica para el posible factor afectado no estuviese localizado en la zona del brazo corto del cromosoma 6 que le falta a la línea 180. La línea celular 180 tiene delecionada una zona del brazo corto del cromosoma 6 donde se localizan los genes estructurales de clase II, aunque también le falta una zona más telomérica donde es posible que estuviesen localizados genes involucrados en la regulación de clase II (DeMars y cols., 1984). **Estos autores mediante el uso de cosmidos solapantes no detectaron que en esta zona se localizara ningún gen regulador de la expresión de clase II.** Por lo tanto, para desechar esta posibilidad o localizar en esta zona el factor responsable del defecto en la expresión de HLA-DP, procedimos a fusionar estas líneas negativas con la LCL 127, que expresa DwP4, pero no DPw2. Esta LCL proviene de la parental diploide 721, pero tiene delecionado el brazo corto del cromosoma 6 que lleva el alelo DPw2, por lo tanto, tiene todos los genes reguladores, y sólo le faltan los genes estructurales de DPw2.

Al fusionar las LCLs negativas con 127, ninguna de ellas era capaz de recobrar la expresión en superficie de HLA-DP, excepto 45.EM15, obteniendo un porcentaje elevado de híbridos positivos (Tabla V). Este mutante se tratará extensamente más adelante, al ser un mutante con

defecto post-transcripcional, ya que expresa RNAm para las dos cadenas de las moléculas de DPw2, pero no recupera la expresión al fusionarse con 180.

De estos datos dedujimos que, a excepción de 45.EM15, ninguna de estas líneas estaba afectada en la zona que le falta al cromosoma 6 de la línea 180 (Tabla V).

Después de obtener este resultado, nos planteamos la secuenciación de las zonas promotoras comunes de los genes de clase II, por lo que procedimos a clonar las secuencias promotoras de estas LCLs mutantes y secuenciarlas. En el caso del 45.EM15 no era necesario porque al tener RNAm para ambas cadenas era evidente que no tenía afectadas estas secuencias promotoras y que su defecto no era debido a ningún factor de transcripción. Se procedió a clonar las secuencias promotoras de las cadenas β de 45.EM7, 45.EM8 y 45.EM14; y las mismas de las cadenas α de 45.EM11 y de 45.EM14 (Figura Northern y Tabla IV).

6. CLONACIÓN DE LOS PROMOTORES DE DPA1*0103 Y DPB1*02012:

Decidimos clonar y secuenciar las regiones promotoras de los genes DPA1*0103 y DPB1*02012 de aquellos mutantes en los que no recuperábamos el fenotipo de expresión de DPw2 tras fusionarlos con la línea celular 180. Para ello se utilizó, de nuevo, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Utilizando oligonucleótidos específicos, que incluían también en este caso las dianas de las enzimas de restricción *SaI* y *EcoR* I, se clonaron 264 pares de bases del promotor de DPB1*02012 y 258 del promotor de DPA1*0103. Estos fragmentos incluyen las secuencias reguladoras consenso comunes a todos los genes de clase II: la caja TATA, y las cajas Y, O, X1, X2 y Z y que van de los nucleótidos - a - de DPA1*0103 y de - a - de DPB1*02012.

Se aisló DNA genómico de los mutantes 45.EM7, 45.EM8, 45.EM11 y 45.EM14 siguiendo el método ya descrito en "Materiales y Métodos". 1 μ g de este DNA, después de ser fragmentado mediante sonicación, era utilizado en una reacción de PCR para clonar los fragmentos de las regiones promotoras indicados, utilizando los siguientes oligonucleótidos:

1) Promotor de DPA1*0103:

- a) 5'- GGGCCCGTCGACGTTGTGGGGTCTATAATTGATG-3'
- b) 5'- CCCGGGGAATTGGAAGTGGAGCTCTCTTGACCA-3'

2) Promotor de DPB1*02012:

a) 5'- CCCGGGGAATTCAGTATCACTGTCTTTCCTCCGT-3'

b) 5'- GGGCCCGTCGACGGAGCTGGAAAAGGATGGCA-3'

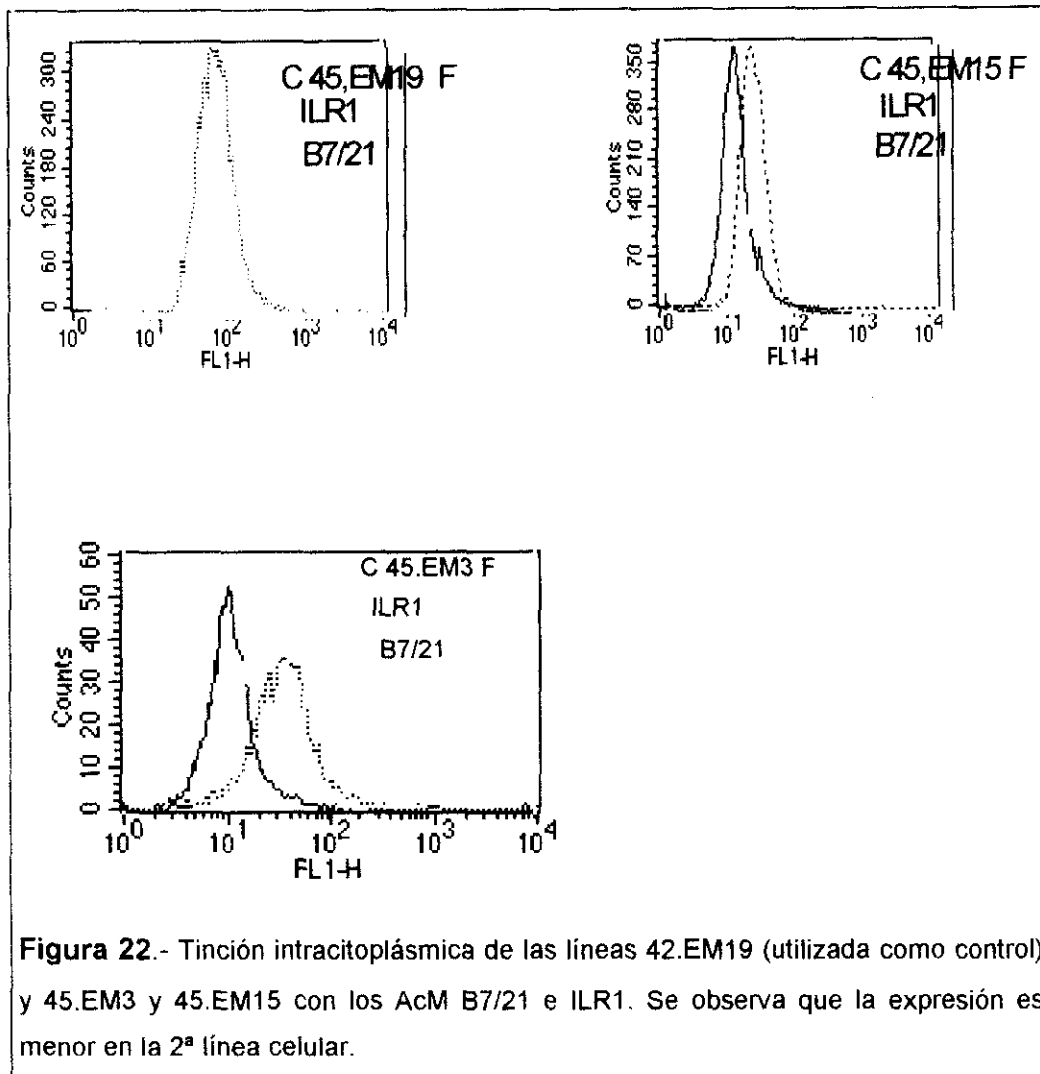
La reacción de PCR se llevaba a cabo en las condiciones descritas en "Materiales y Métodos", salvo que se aumentaba el número de ciclos hasta 35.

La clonación de estos fragmentos en el vector pUC18 y su posterior secuenciación no reveló la existencia de mutaciones en ninguno de los mutantes, con respecto a las secuencias de los promotores de las línea parental 45.1.

En estos mutantes el defecto debe estar en *cis*, al ser negativos al fusionarse con 180. Pero en la zona descrita hasta ahora como capaz de controlar la expresión de los genes que codifican para las moléculas de clase II no había mutaciones, por lo que las secuencias reguladoras no deben localizarse todas en el fragmento secuenciado.

5.7. MUTANTES POST-TRANSCRIPCIONALES

De los resultados del Northern se concluye que 2 de los mutantes de las líneas haploides no estaban dañados en ningún factor de transcripción,



ya que producían las dos cadenas de la molécula de HLA-DP a RNAm. Eran 45.EM3 y 45.EM15.

Al expresar RNAm para las dos cadenas era posible que este RNA se tradujese y existiesen moléculas del dímero $\alpha\beta$ en el citoplasma. Si esto fuese así, deberían ser detectados mediante tinción citoplásmica y análisis por CDF.

Se utilizó como control positivo la línea haploide 45.EM19 caracterizada por Arroyo y cols. (1994). Esta línea poseía una mutación en el

gen estructural de la cadena β que le impedía anclarse en membrana, por lo que no era posible detectarla en superficie, aunque sí en el citoplasma, mediante tinción con AcM y análisis por CDF. Como podemos observar en la fig37, tanto 45.EM3 como 45.EM15 son claramente positivas, respecto del control de tinción. Comparando con la intensidad de fluorescencia obtenida por 45.EM19 teñido con los mismos AcM, se puede concluir que claramente, presentan dímeros de HLA-DP en el citoplasma.

Con el fin de comprobar si el fenotipo de estos mutantes pudiera explicarse por la existencia de alguna mutación en los genes estructurales que codifican para los polipéptidos $DP\alpha$ y $DP\beta$, al igual que ocurría en 45.EM19, decidimos clonar los genes $DPA1^*0103$ y $DPB1^*02012$. Para ello se obtuvo el cDNA total de cada una de las líneas a partir del RNA, utilizando la enzima transcriptasa reversa. A partir de este cDNA y mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron las secuencias de $DPA1^*02012$ y $DPA1^*0103$. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

1) Oligonucleótidos utilizados para amplificar $DPA1^*0103$:

5'-CCGAATTCAGTCTCCGAGGAGCTGGGGCC-3'

5'-CCGTCGACCTCTCCTAAGTCCTCTTCTGT-3'

2) Oligonucleótidos utilizados para amplificar $DPB1^*02012$:

5'-CCGAATTCGCTCACAAGTGGTCCAGG-3'

5'-CCGTCGACCAAGTGAGCTCAGGAACCTG-3'

Estos oligonucleótidos permiten el aislamiento de los genes estructurales completos, que incluyen las secuencias que codifican para los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, los dominios transmembranales y los dominios carboxiterminales (citosólicos). Los oligonucleótidos incluyen las secuencias dianas de las enzimas de restricción *SaI* I y *EcoR* I, lo que permite subclonar los fragmentos amplificados, una vez digeridos con estas enzimas, en el vector pUC18, previamente digerido con las mismas enzimas.

Los fragmentos de DNA clonados en pUC18 fueron secuenciados mediante el método "dideoxi" en un secuenciador automático ALF (Pharmacia), de acuerdo con el protocolo que se indica en "Materiales y

Métodos” y utilizando los oligonucleótidos “universal” y “reverso” marcados con fluoresceína. Se secuenciaron tres clones de DPA1*0103 y tres de DPB1*02012 para cada uno de los dos mutantes.

Al analizar las secuencias de DPA*0103 y DPB*02012 de 45.EM3 no se detectó ninguna diferencia con los genes silvestres. Por lo que el defecto debía encontrarse en alguna secuencia en *cis* no detectada por nuestro sistema de secuenciación ya que nosotros secuenciamos los genes estructurales a partir del RNA transcrito, *por lo tanto, no podemos detectar las variaciones en las secuencias reguladoras que se encuentran en los intrones del gen estructural*. Si no fuese así, también podría tratarse de algún factor que fuese responsable del transporte de las moléculas de HLA-DP a superficie o que interviniese en el procesamiento del péptido presentado por estas moléculas.

Por ello, y como hemos mencionado anteriormente, fusionamos 45.EM3 con la línea HLA - 180, para ver si complementaba la mutación y recuperaba la expresión de HLA-DP en superficie.

Al fusionar 45.EM3 con 180 obtenemos híbridos que recuperan la expresión de HLA-DP en superficie (Tablas IV, V y VI). Por lo tanto, esto demuestra que no están implicadas secuencias en *cis*, sino que, en efecto, existe algún factor necesario para la expresión de las moléculas de clase II en superficie que le falta a 45.EM3.

Mediante las fusiones con los otros mutantes observamos que no forma ningún grupo de complementación.

Por su parte, la secuencia de los genes que codifican para la cadena α y para la cadena β de 45.EM15, tampoco mostró diferencias con los genes de la línea parental 45.1, por lo que seguimos, como ya se ha mencionado antes, el mismo proceso que para 45.EM3 y lo fusionamos con 180. Sin embargo, sorprendentemente, 45.EM15 no era capaz de recuperar la expresión de HLA-DP en superficie. Fusionamos este mutante con la línea 127 que expresa DPw4 pero no DPw2 para comprobar que no existiese algún factor de regulación post-transcripcional alterado cuyo gen codificase en la zona del MHC que le falta a 180. Como se observa en la fig38, y se muestra en la tabla VIII, los híbridos de 127*45.EM15 recuperan la expresión de DPw2.

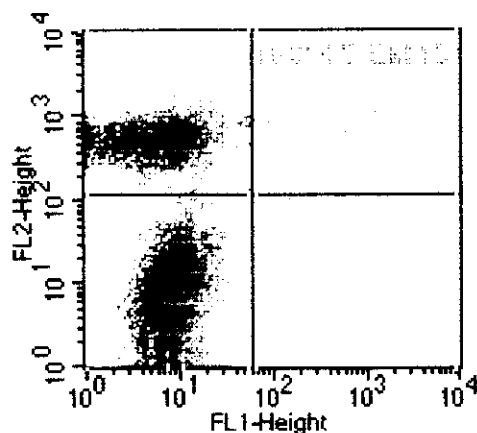


Figura 23.- Resultado negativo de la fusión de 180*45.EM15. Como se observa en la figura no se producen híbridos positivos, al contrario de lo que ocurre al fusionar 45.EM15 con 127 y con otras líneas.

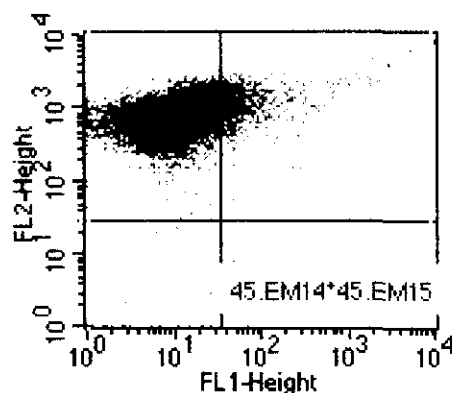
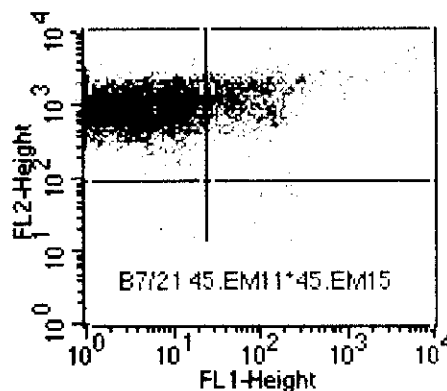
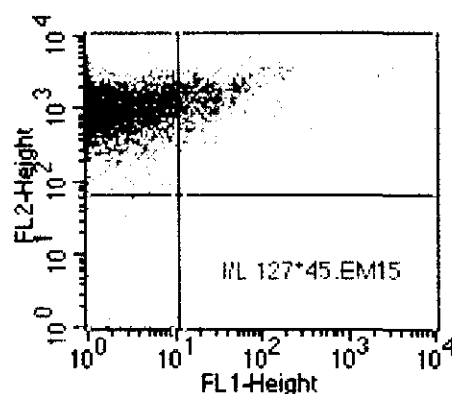
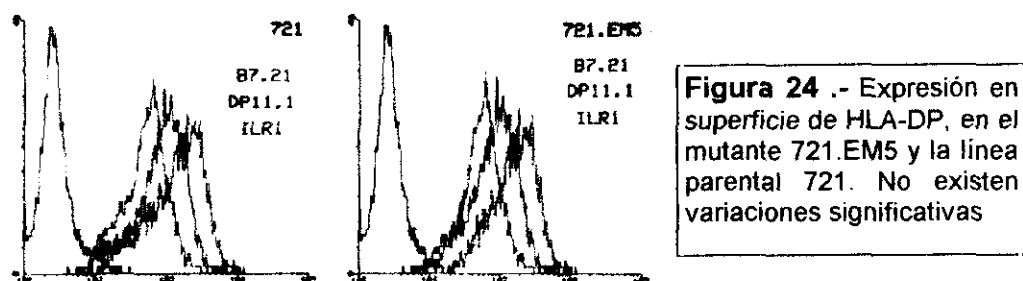


Figura 24.- Resultado de las fusiones de 45.EM15 con 127 (A), 45.EM11 (B), 45.EM14 (C). El % de híbridos positivos para HLA-DP es de 80% (A), 95% (B), 83% (C). Estos % se obtienen después de comparar los híbridos positivos con los híbridos totales. Tabla V

Para confirmar este resultado, realizamos fusiones entre 45.EM15 y otras líneas mutantes negativas cuando formaron híbridos somáticos con 180, como son 45.EM11 y 45.EM14. En la figura 24 se muestra el resultado de estas fusiones, que es positivo en ambos casos. Esto confirma que el gen del factor alterado necesario para la expresión de DP en la superficie celular en la línea 45.EM15, se localiza en la zona del MHC que no está presente en la línea celular 180. Por el contrario en las fusiones positivas los % eran muy superiores y la intensidad de fluorescencia de los híbridos positivos era alta (fig. 38). Por lo tanto, cuando la línea celular 45.EM15 se fusiona con una

línea que complementa su mutación el aumento de células positivas es espectacular, mientras que si no lo complementa los híbridos producidos no expresan HLA-DP por encima de los niveles de los controles.



Otro mutante que parece estar afectado después de la transcripción es 721.EM5. Este mutante no es reconocido por los CTLs DP2 específicos y sí por los DP4 (Arroyo, 1992). Como ya se ha mencionado, esta línea celular diploide mutante no presentaba ninguna variación significativa respecto a la unión de un anticuerpo que reconoce HLA-DPw2 (ILR1) con la línea parental 721. Tampoco mostraba diferencias respecto de anticuerpos que son monomórficos para HLA-DP (B7/21) ni para un AcM que reconoce mayoritariamente -DPw4 (DP11.1) (fig. 40).

Para estudiar si existía alguna variación en algún otro epítipo de DPw2 de 721.EM5, se realizó una tinción de superficie con una batería de AcM anti-DP (Tabla IX) que reconocen zonas diferentes de la molécula o zonas similares pero de forma distinta. Podríamos relacionar, así, el posible epítipo variado con el no reconocimiento por parte de los CTLs DP2 específicos.

ANTICUERPO	EPÍTOPO PROPUESTO	ESPECIFICIDAD
NFLD.M60	"DE" en 55-56	3, 9, 10, 14, 17 & DR11, débil en 2.1 y en 4.2
NFLD.M63	≅ M60	3, 4.2, 9,14
NFLD.M64	≅M60	2.1, 3, 4.2, 9, 10, 14, 16, 17 & DR11
NFLD.M66	"AV" en 85-86	Todos - 2s, 4s, 15, 18
NFLD.M67	MONOMÓRFICO DP	
NFLD.M68	MONOMÓRFICO DP	
NFLD.M69	MONOMÓRFICO DR+DP	
NFLD.M70	CADENA α (02)	Todos con DPA1.0201

NFLD.M73	=M60	Débil DP1
NFLD.M75	≡M63	
NFLD.M77	"L" en 11 & "FV" en 35-36	3, 6, 9, 10, 14, 17
NFLD.M101		2, 3, 4, 6, 9, 10, 14, 16, 17 & DR11

TABLA IX.- Anticuerpos utilizados para analizar las moléculas de HLA-DP2 de 721.EM5, con su especificidad y zona de HLA-DP reconocida, si se conoce .

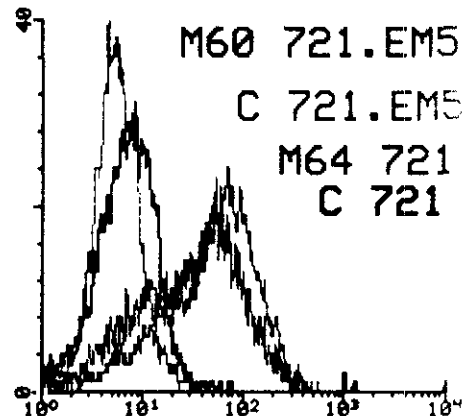
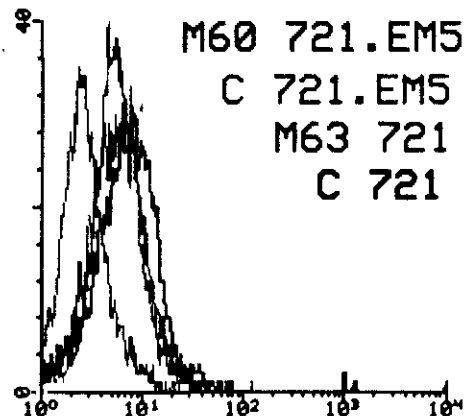
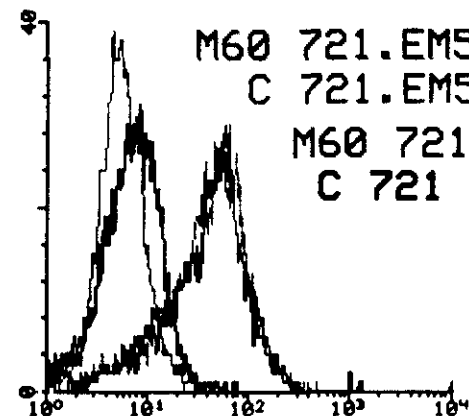
Los datos de CDF muestran que no existen variaciones significativas entre los perfiles de tinción con los AcM utilizados entre la línea parental 721 y la línea mutante 721.EM5 (FIG 41). Por lo tanto, la mutación no afecta a los epítomos reconocidos por los AcM utilizados, a pesar de que cubren una amplia extensión del dímero $\alpha\beta$.

Era posible que la mutación afectase a la unión del péptido y que esta modificación no variase los epítomos reconocidos por los AcM pero sí al reconocimiento por los CTLs. Esto supondría que los residuos involucrados estarían en la zona de unión con el péptido y no los podríamos detectar más que por secuenciación de los genes estructurales de la cadena α y de la cadena β de la molécula de HLA-DP2 del mutante 721.EM5.

Para ello procedimos a la clonación de los genes de DPA1*0103 y DPB1*02012 de 721.EM5. A partir de RNA total se sintetizó, mediante la transcriptasa reversa, el cDNA. Posteriormente, utilizando oligonucleótidos específicos y mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron las secuencias completas de los genes buscados, incluyendo las regiones 5' y 3' no traducidas y el péptido señal. Los oligonucleótidos específicos fueron los siguientes:

- Oligonucleótidos utilizados para amplificar DPA1*0103:
5'-CCGAATTCGTCTCATCTGCCTCCACT-3'
5'-CCGTCGACAATACTGAAAGTTTTATT-3'
- Oligonucleótidos utilizados para amplificar DPB1*02012:
5'-CCGAATTCTTTTTCCTGACTGCA-3'
5'-CCGTCGACAAAGGAAAACAAACAGT-3'

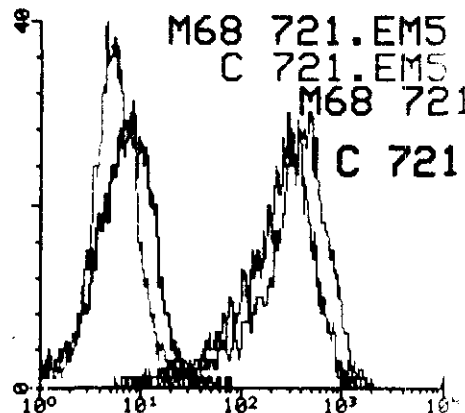
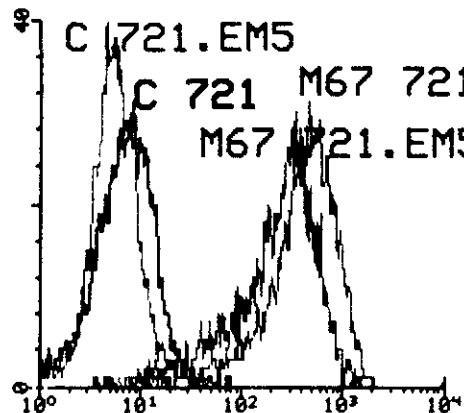
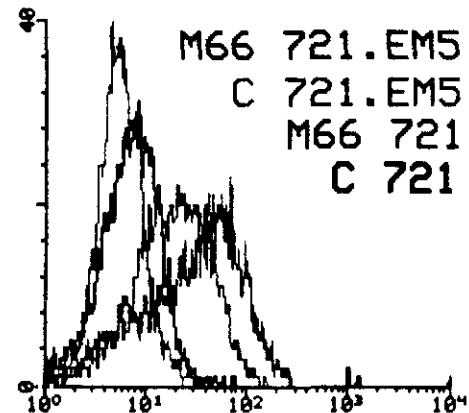
#111/30/JAU13N0001\FL1\Fluorescence 1 #111/30/JAU13N0001\FL1\Fluorescence 1 #111/30/JAU13N0001\FL1\Fluorescence 1



#111/30/JAU13N0001\FL1\Fluorescence 1

#111/30/JAU13N0001\FL1\Fluorescence 1

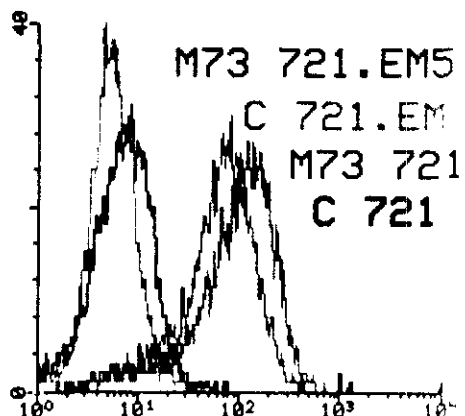
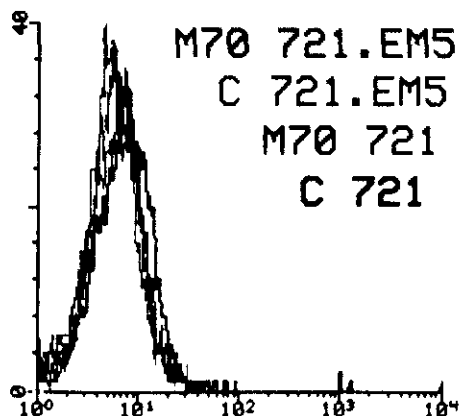
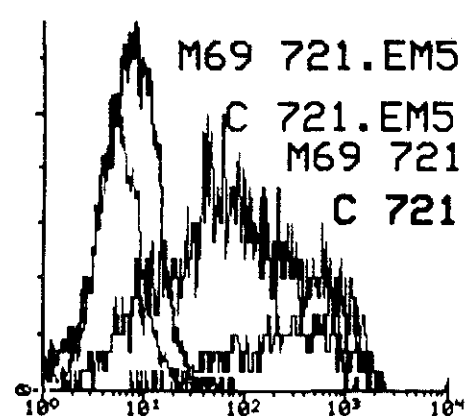
#111/30/JAU13N0001\FL1\Fluorescence 1



#111/30/JAU13N0001\FL1\Fluorescence 1

#111/30/JAU13N0001\FL1\Fluorescence 1

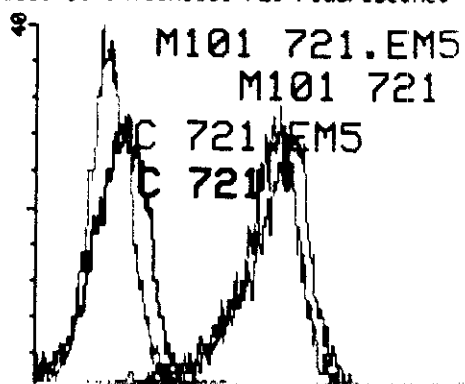
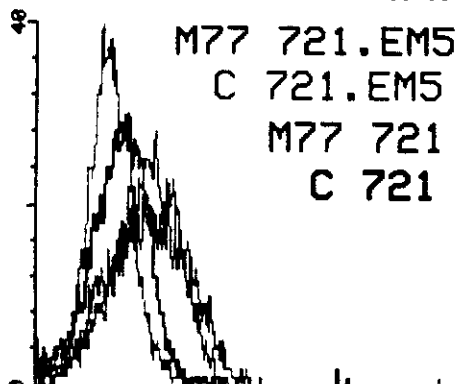
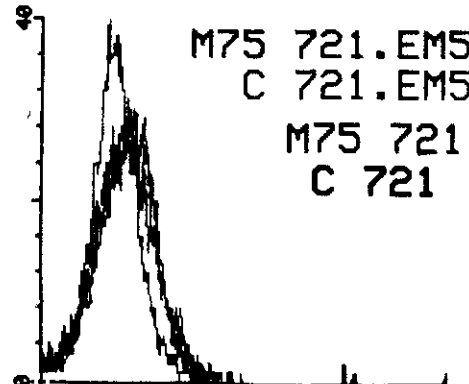
#111/30/JAU13N0001\FL1\Fluorescence 1



#111/30/JAU13N0001\FL1\Fluorescence 1

#111/30/JAU13N0001\FL1\Fluorescence 1

#111/30/JAU13N0001\FL1\Fluorescence 1



Estos oligonucleótidos llevaban incluidas las secuencias reconocidas por EcoRI y Sall, lo que facilitaba clonar posteriormente los productos amplificados. De esta forma, después de amplificados ambos cDNAs, se digirieron simultáneamente con las enzimas citadas anteriormente y se subclonaron en pUC18, previamente digerido con las mismas enzimas.

El DNA subclonado se secuenció según se describe en Material y Métodos. Se secuenciaron tres clones distintos de DPA1*01013 y tres de DPB1*02012.

Los resultados obtenidos de la secuenciación de los genes de las cadenas alfa y beta de DP2 del mutante 721.EM5 muestran que no existe ninguna variación con respecto de los genes silvestres. Esto implica, por lo tanto, que la mutación no afecta a los genes de clase II, sino a algún factor involucrado en el procesamiento del antígeno, presentando el mutante un péptido que modifique de tal manera la zona de unión con el TCR que éste no sea capaz de activar al CTL o, simplemente, que no sea reconocido por él. Este factor sería específico del procesamiento antigénico de alelo, ya que afecta a DPw2 y no a DPw4. Otra posibilidad es que la molécula de HAL-DPw2 no fuese capaz de activar a los CTLs al existir algún fallo en el procesamiento del RNAm.

VI. DISCUSIÓN

El estudio de líneas celulares que presentan alterada la expresión de las moléculas del MHC de clase II es vital para la comprensión de la regulación de esta expresión y de su funcionamiento dentro de la maquinaria del Sistema Inmunitario, ya que dentro del contexto de las moléculas de clase II es donde se van a presentar los péptidos antigénicos a las células T ayudadoras

Desde esta perspectiva nos hemos propuesto estudiar las líneas linfoblastoides humanas defectivas en la expresión de HLA-DP que han sido generadas por nuestro grupo, en un intento de complementar los resultados anteriores y centrar nuestro interés hacia la regulación de la expresión de los genes que codifican las cadenas α y β de las moléculas de HLA-DP.

6.1 REGULACIÓN CONJUNTA O INDIVIDUALIZADA DE LOS GENES DE CLASE II DEL MHC.

Las primera líneas linfoblastoides humanas defectivas en la expresión de moléculas del MHC fueron generadas por Pious y cols. (1973). Posteriormente, se han generado gran variedad de líneas *in vitro* o a partir de células de pacientes con síndromes de inmunodeficiencias, mutantes que no expresan ninguna o alguna de las moléculas del MHC (Kavathas y cols., 1980; DeMars y cols., 1983, 1984; Glimcher y cols., 1983; Townsend y cols., 1989; Koppelman y Cresswell, 1990; Ono y cols., 1991; Seidl y cols., 1992). Todas estas líneas se han utilizado en estudios funcionales (Shimizu y cols., 1988; Maurer y Gorski, 1991) o en estudios de regulación de la expresión de moléculas de clase II (Bénichou y Strominger, 1991; Ono y cols., 1991; Seidl y cols 1992; Steimie y cols. 1993; Lisowska-Grosspierre y cols., 1994). La mayoría de estas líneas son defectivas en la expresión de todas las moléculas de clase II.

Esta es una de las razones por las que se ha sugerido que los genes componentes de la familia del MHC de clase II se regulan coordinadamente (Sullivan y cols., 1988; Benoist y Mathis, 1990; Glimcher y Kara, 1992). Los estudios de sobre varias líneas celulares mutantes defectivas en la expresión de todos los tipos de moléculas de clase II, apoyaron esta hipótesis. Sin embargo, la descripción de líneas que expresan DR y DP pero no DQ (Glimcher y Kara, 1992), contradice esta hipótesis.

hipótesis. Sin embargo, la descripción de líneas que expresan DR y DP pero no DQ (Glimcher y Kara, 1992), contradice esta hipótesis.

También se sabe que los diferentes tipos de moléculas de clase II se activan en distintos momentos de la diferenciación celular (Marcadet y cols., 1985; Symington y cols., 1985; De Preval y cols., 1988), y se ha descrito la expresión, aunque en baja cantidad, de DQA en una línea celular aislada de un paciente con una inmunodeficiencia congénita que provoca la no expresión de moléculas de clase II. Más resultados que sugieren que los genes de clase II no se regulan coordinadamente, vienen de experimentos de competición con oligonucleótidos sintéticos correspondientes a las secuencias *cis* conservadas de diferentes genes, en los que se analiza la capacidad de competir entre sí en ensayos de retardo en gel (Boothby y cols., 1989; Celada y cols., 1989). Los datos sobre la capacidad de varios factores clonados que actúan en *trans*, para unirse sólo a una subtipo de genes de clase II, también apoyan la regulación independiente. Así mXBP/HB16 y hXBP-1, proteínas que se unen a las cajas X_2 de $A\alpha$ y $DR\alpha$ (Glimcher y Kara, 1992), respectivamente, muestran afinidades diferentes para los distintos sitios X_2 de clase II *in vitro*. Esos datos sugieren la existencia de numerosas proteínas que se unen a DNA con afinidad diferencial para las secuencias conservadas en los diferentes genes. Los sitios X_1 y X_2 de los distintos genes de clase II pueden ser reconocidos por diferentes factores reguladores (Glimcher y Kara, 1993).

Ono y cols. (1991) describen un mutante que expresa DQ pero no DR ni DP, y que cuando se fusiona con un hibridoma de ratón que expresa clase II murina, recupera la expresión de DR y DQ. Por lo tanto, esta es el primer caso donde parece estar implicado un factor en *trans* que es específico de isotipo de clase II. Hasta ahora sólo se han descrito células en las que existe diferente regulación de los genes de DQ con respecto a DR y DP (Symington y cols., 1985; Hume y cols., 1989; Blanck y cols., 1990). Estos datos han sido interpretados indicando la necesidad de otros factores de transcripción, además de los de HLA-DR y -DP, para la transcripción de HLA-DQ. El fenotipo del mutante descrito por Ono y cols. (1991) sugiere que los genes de HLA-DR y -DP requieren un factor activador que no es necesario para la transcripción de HLA-DQ.

En varias líneas endoteliales y de melanoma se han descrito diferentes respuestas de los genes de clase II frente a la inducción por IFN- γ (Anichini y cols., 1988). Los eosinófilos humanos expresan DR pero no DQ en respuesta a GM-CSF (Lucey y cols., 1989), además clones de células T CD8⁺, expresan moléculas de HLA-DR y -DP pero no -DQ en superficie (Diedrichs y Schendel, 1989).

Por lo tanto, mientras que la regulación coordinada de los genes de clase II parece ser llevada a cabo a través de elementos comunes en *cis*, esta regulación puede ser mediada por factores comunes y/o específicos de gen que reconocen estos elementos comunes.

Estos datos demuestran que los genes de clase II pueden ser regulados coordinadamente, pero que su regulación puede ser más fina, incluso hasta el límite de ser específica del isotipo de moléculas de clase II y que esta especificidad puede llegar a ser de alelo (Andersen & cols., 1991).

6.2 MUTANTES CON ALTERACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE HLA-DP

- MUTANTES CON ALTERACIONES EN FACTORES REGULADORES EN *TRANS*.

Hasta el momento no se han descrito otro tipo de mutantes con expresión diferencial de las moléculas de clase II que los de Ono y cols. (1991). Los mutantes descritos en este trabajo son los primeros que presentan expresión diferencial de HLA-DP con respecto a HLA-DR y -DQ. Los datos existentes sobre regulación diferencial de isotipos de clase II provenía de líneas que expresaban DR y DP pero no DQ y viceversa (revisado en Glimcher y Kara, 1992). Los datos hasta ahora descritos, hacían pensar que existía una regulación coordinada de HLA-DR y -DP, independientemente de HLA-DQ.

Una característica que define a los mutantes estudiados en este trabajo es que los factores que parecen haber sido alterados no regulan la expresión de todos lo subtipos de clase II, sino que son específicos de HLA-DP. Pueden incluso ser específicos de alelo, en el caso de las líneas

diploides, y parecen ser específicos de cadena (α o β) en la mayoría de los casos.

Que existen diferencias de regulación entre alelos del mismo isotipo de moléculas de clase II ha sido descrito por Andersen y cols. (1991) para HLA-DQ y por Louis y cols. (1994) para HLA-DR β . Esta diferente regulación se basa en el polimorfismo que presentan las secuencias reguladoras de 7 alelos de DQ β y en la región proximal del promotor de DR β . Estas diferencias en las secuencias se corresponden con diferencias de unión de proteínas reguladoras nucleares. Hasta la fecha no ha sido descrito para HLA-DP tal polimorfismo alélico, aunque algunos datos aportados en este trabajo se explicarían si existiese. El trabajo de Andersen y cols. Identifica una importante fuente de diversidad dentro del MHC de clase II y sugiere la posibilidad de que estas regiones polimórficas confieran diferencias en expresión, capacidad de inducción y en especificidad de tejido a las moléculas de clase II. Alteraciones en los factores que se unen a estas regiones polimórficas impedirían seguramente, la normal expresión de las cadenas implicadas, generalmente las cadenas β . Así se podrían explicar las alteraciones en la expresión de las cadenas β de los mutantes 45.EM1, 45.EM2, 45.EM5, 45.EM9, 45.EM13 y 45.EM16. Recientemente, Sugarawa y cols. (1994) han descrito un factor que se une específicamente a la secuencia nucleotídica promotora de DPA. La unión se localiza en dos secuencias conservadas (S y J) que son necesarias para la actividad máxima del promotor de DPA. La actividad de esta proteína no afecta a la transcripción de otros promotores de clase II. Sería, por tanto, un factor activador específico de cadena, que está también implicado en la regulación de DPA inducida por IFN- γ . Han sido descritos otros factores que se unen específicamente al promotor de DRA (Ting y Baldwin, 1993). Para este promotor se han encontrado, al menos, dos factores que se unen al octámero de HLA-DRA, secuencia, ésta, que sólo se encuentra en este promotor. Tenemos, pues, las premisas para entender los resultados obtenidos en este trabajo. La existencia de factores específicos de isotipo de moléculas de clase II, específicos de alelo de clase II y específicos de cadena del dímero de clase II.

Los resultados del Northern indican que son mayoría los mutantes que están afectados en algún factor que regula la expresión de la cadena β . Los resultados de los grupos de complementación aportados por los experimentos de fusiones, indicarían que estarían afectados 4 factores de regulación de la cadena β y 1 que regularía la expresión de la cadena α de HLA-DPw2.

El hecho de que el tratamiento con IFN- γ y con IL-4 no restaure la expresión de las moléculas de HLA-DP en superficie demuestra que la alteración de los factores reguladores afectados no se debe a una disminución en la capacidad de activación de estos factores. Más bien induce a pensar en una alteración física de los mismos. También demuestra que estos factores son necesarios para la estimulación inducible de los genes de HLA-DP. Algo similar ocurre en el caso del clon 13 estudiado por Ono y cols. (1991), que sólo expresa HLA-DQ y en el que la expresión de HLA-DR y -DP no se recupera después del tratamiento con IFN- γ .

La generación de híbridos somáticos entre mutantes que no expresan moléculas de clase II ha sido ampliamente utilizado para detectar factores de transcripción en los distintos grupos de complementación localizados (Bénichou y Strominger, 1991; Ono y cols., 1991; Seidl y cols., 1992; Steimie y cols., 1993; Lisowska-Grospierre y cols., 1994). Todos ellos han utilizado líneas celulares mutantes que no expresaban ninguna molécula de clase II, excepto en los casos de Bénichou y Strominger y de Ono y cols., que utilizaban el clon 13. Por lo tanto, los factores definidos regulan de manera general la expresión de clase II. Nuestro caso es distinto, por que al expresar los mutantes tanto DR como DQ, implica que los factores generales de expresión no están afectados. Por lo que nuestra búsqueda se ciñe a factores reguladores en *trans* y secuencias en *cis* específicas de DP, de DPw2 en el caso de los mutantes diploides y además, en la mayoría de los casos de los mutantes haploides, específicos de cadena.

El hecho de que 45.EM1, 45.EM2 y 45.EM5 formen un grupo de complementación, parece indicar que puede tratarse del mismo mutante, ya

que los tres tienen el mismo origen. Sin embargo, puede tratarse de tres mutaciones diferentes que afecten al mismo factor de regulación impidiéndole ejercer su función en los tres casos. De la observación de fenotípica de las células y de su comportamiento en cultivo, 45.EM1 y 45.EM2, se parecen más entre sí que 45.EM5. Los datos proporcionados por el análisis densitométrico de los RNAm muestran que los 3 mutantes expresan la cadena α más que la línea parental. Sin embargo, 45.EM1 y 45.EM2 la expresan en mayor cantidad que 45.EM5 (Tabla IV). Podría ser, entonces que sólo fuesen dos mutaciones que afecten al mismo factor.

El caso del 45.EM3 es muy interesante. Es una línea positiva al fusionarla con 180, lo que implica que ninguna secuencia reguladora en *cis* está afectada, se comprobó, de todos modos, mediante secuenciación del DNA, que los genes estructurales no estaban afectados, se detectó RNAm para las dos cadenas de las moléculas de HLA-DP y, finalmente, se identificaron dímeros de HLA-DP en el citoplasma. No hemos podido concretar si la señal de fluorescencia proviene de algún compartimento determinado del citoplasma o se encuentra dispersa por el citosol. Nuevos experimentos se están llevando a cabo para dilucidar este punto. De la observación al microscopio de fluorescencia parece que la señal se encuentra dispersa por el citosol. Esto implicaría que el dímero no es retenido en el RE y sale al citosol. Esto supondría un fallo en las chaperoninas encargadas de mantener el complejo moléculas de clase II-II en el RE. Si fuese así, ninguna molécula de clase II se expresaría en superficie y este mutante sería clase II-, y no es así.

Guardiola y cols (1995) han definido una zona de la región 3' que no se traduce del RNAm de las cadenas α y β de las moléculas de DR, que interacciona con dos o más proteínas que se encuentran compartimentalizadas en núcleo y citoplasma, y que pueden intervenir en el procesamiento adecuado del RNAm. Si esta región no se encuentra en el transcrito el RNAm producido no es retenido en el RER sino que se libera en el citoplasma donde se asocia a ribosomas libres. Por lo tanto, se pueden producir moléculas en el citoplasma que pueden ser reconocidas por AcM. En nuestro caso, no podemos saber si esta región está afectada o no ya que

la estrategia de secuenciación implica el uso de cDNAs a partir del RNAm por lo que no podemos asegurar que esa zona ha sido secuenciada o no.

Por otro lado, ha sido descrito para mutantes interespecíficos entre líneas B humana y líneas B de ratón (De Lerma-Barbaro y cols., 1994), que existe un mecanismo post-traduccionaI diferente para los tres tipos de moléculas de clase II, sintetizándose RNAs para las tres moléculas pero sólo expresándose DR y DP. También detectan dímeros de DQ en el citoplasma, aunque en baja cantidad, por lo que aseguran que existe un bloqueo post-transcripcional de las moléculas de DQ. Tal vez estemos ante un mecanismo similar. De hecho, el análisis densitométrico de los niveles de RNAs para las cadenas α y β de las moléculas de HLA-DP del mutante 45.EM3, muestra que la cadena α se expresa como la de la línea parental, mientras que la cadena β se expresa menos (63% de la expresión de 45.1).

El hecho de que al fusionar 45.EM9 y SJO, los híbridos producidos no recuperen la expresión en superficie de HLA-DP, supone que no se complementan las dos mutaciones y que los dos líneas deben estar dañadas en el mismo factor de transcripción. Se ha descrito que SJO no tiene una proteína que se une a la zona promotora del gen de DRA, aunque este factor debe unirse también a las otras secuencias de los genes del MHC, porque activa también la expresión de DP y DQ, ya que SJO recupera la expresión de todos los subtipos de moléculas clase II, cuando es complementado por fusión.

45.EM9 expresa normalmente, tanto DR como DQ, y transcribe normalmente el RNAm para la cadena α de DP, aunque sus niveles de expresión están por debajo de los de la cadena α de la línea parental (48%), por lo que debe existir alguna subunidad específica para la cadena β de DP que está afectada en esta línea celular, asumiendo que sólo un gen, que codifica para un factor activador en *trans*, está alterado en cada línea celular.

Bénichou y Strominger (1991) han descrito un caso similar en el que una línea mutante que no expresa DQ, pero sí DR y DP, y sin embargo, forma grupo de complementación con otras células que no expresan ninguna molécula de clase II. Según estos autores existen dos posibilidades:

- La primera es que un factor normalmente activa o se une a, al menos, dos proteínas o zonas del DNA, cada una específica para la transcripción de los genes de DR/DP y de DQ. Este factor poseería, al menos, dos regiones activadoras o reconocedoras.
- La otra posibilidad es que un mismo gen podría generar distintos RNAs mediante diferente procesamiento y producir de esta manera, diversos factores de transcripción. El producto de estos RNAs sería capaz de activar los genes de DQ o de DR/DP. Por supuesto, una región común sería la encargada de la activación, pero cada factor poseería su propio dominio específico de reconocimiento. La mutación de cualquiera de estos dominios alteraría la capacidad de la proteína de unirse a los promotores de DR, DP o DQ conduciendo a la expresión diferencial de estas moléculas y produciendo distintos fenotipos dentro del mismo grupo de complementación. En este caso, podemos señalar que al ser 45.EM9 positivo para DR y DQ y negativo para DP, deben ser, al menos, tres los posibles dominios de reconocimiento.

En el caso de 45.EM13 y 45.EM16 sólo podemos establecer que tienen alterado distintos factores de regulación de la cadena β de la molécula de DP ya que representan dos grupos de complementación.

45.EM13 posee una expresión menor del RNA de la cadena α de HLA-DP (33%). Sin embargo, recupera la expresión en superficie del dímero $\alpha\beta$ al fusionarse con 180. El factor alterado en este caso, debe afectar a la regulación de las dos cadenas y activar su transcripción, ya que la expresión en los híbridos formados es normal.

Por el contrario, 45.EM18 es el único mutante estudiado que presenta alterado un factor de regulación de la cadena α de DP. Sobreexpresa la cadena β casi 3 veces respecto de la línea parental 45.1. Tiene un comportamiento especial en las fusiones somáticas, ya que es el mutante que produce mayor porcentaje de híbridos positivos cuando lo fusionamos, independientemente de la línea celular mutante con la que se le fusione. Por supuesto, forma el solo un grupo de complementación.

- **MUTANTES CON ALTERACIONES EN SECUENCIAS REGULADORAS EN C/S.**

Las líneas celulares que no recuperan la expresión de las moléculas de HLA-DP en superficie al fusionarlas con la línea 180 (HLA-) pueden tener alterada alguna secuencia reguladora. Hasta ahora nuestros intentos para identificar la región dañada han sido infructuosos. La secuenciación de las zonas promotoras posiblemente afectadas, indicó que ninguna de estas secuencias divergía de las secuencias silvestres. La fusión de estas líneas con la línea 127 que expresa normalmente todos los genes de la línea parental excepto los genes estructurales de HLA-DPw2, no produjo la expresión en superficie de moléculas DPw2, excepto en el caso de 45.EM15, del que hablaremos más adelante. HABLAR 45.EM14

Por lo tanto, la posible alteración no se debe a algún factor en *trans* localizado en la zona del MHC.

El caso de la línea linfoblastoide mutante 45.EM15 es extremadamente difícil de interpretar. Expresa RNAm para las dos cadenas de HLA-DPw2, aunque la cadena α en menor proporción que la de la línea parental 45.1 (66.1%). Se han detectado moléculas de HLA-DP en el citoplasma mediante tinción citoplásmica y CDF y al fusionarla con 180 no se producen híbridos positivos. Sin embargo, al fusionarla con 127, se produjeron híbridos positivos para DPw2. Esto indicaba claramente que este mutante estaba afectado en un factor que se localizaba dentro de la región del MHC. Las posteriores fusiones con mutantes negativos con 127 confirmaron estos resultados. Podríamos estar ante un mutante de características similares a 45.EM3.

Al expresar moléculas de HLA-DP en el citoplasma parecía indicar que el problema radicaría en el transporte de estas moléculas a la superficie de la célula. Los niveles de expresión de los RNAs de las moléculas de HLA-DP, no indicaban que se tratase de un bloqueo post-transcripcional (De Lerma-Barbaro y cols., 1994), aunque no se puede descartar con los datos disponibles hasta ahora.

Se sabe que en la zona del MHC se localizan genes que codifican para proteínas implicadas en el procesamiento antigénico y en el transporte

de proteínas al RE (Cresswell, 1994). También se han localizado en esa región los genes de determinadas proteínas implicadas en el mantenimiento de los dímeros de clase II en el RER y en el ensamblaje óptimo del nonámero formado por la Ii y las cadenas α y β de clase II (Cresswell, 1994; Bénaroch y cols., 1995). Podría ocurrir que una proteína encargada del mantenimiento de las moléculas de HLA-DP en el RER para su ensamblaje correcto con la Ii no funcionase correctamente, y dejase escapar los dímeros inestables de DP, siendo imposible que éstos alcanzasen la superficie celular (Bénaroch y cols., 1995).

Otra posibilidad es que estuviese dañado la incorporación del péptido a las moléculas de HLA-DP, aunque si fuese así deberíamos ser capaces de detectar algo de expresión de moléculas de HLA-DP vacías en superficie (alrededor de un 30% de la expresión de la línea parental (Mellins y cols., 1991)). Esto no se ha detectado.

El mutante 721.EM5 es interesante ya que es reconocido por AcMs anti-DP en la misma forma que la línea parental, incluso por el AcM ILR1 que es específico de DPw2, diferenciando perfectamente, los dos alelos. Sin embargo, no es lisado por los CTLs DPw2 específicos. Hasta donde nosotros sabemos, la línea diploide 721.EM5, es el primer mutante, seleccionado por CTLs, que está afectado en el reconocimiento por parte de CTLs alelo específicas. Este hecho podría hacer pensar que existe una mutación en los genes de las moléculas de DPw2 que impediría la unión del péptido adecuado y produciría el no reconocimiento por parte de los CTLs. El análisis de las secuencias de estos genes nos muestra que no existe ninguna alteración respecto de los genes silvestres, por lo que, el defecto podría estar en el procesamiento del péptido. Es decir, debe existir alguna proteína implicada en el procesamiento del péptido que produce que éste no sea reconocido en el contexto de HLA-DPw2. Esto implicaría un procesamiento antigénico específico de alelo, es decir, que los péptidos presentados por las moléculas DPw4 son distintos de los presentados por DPw2.

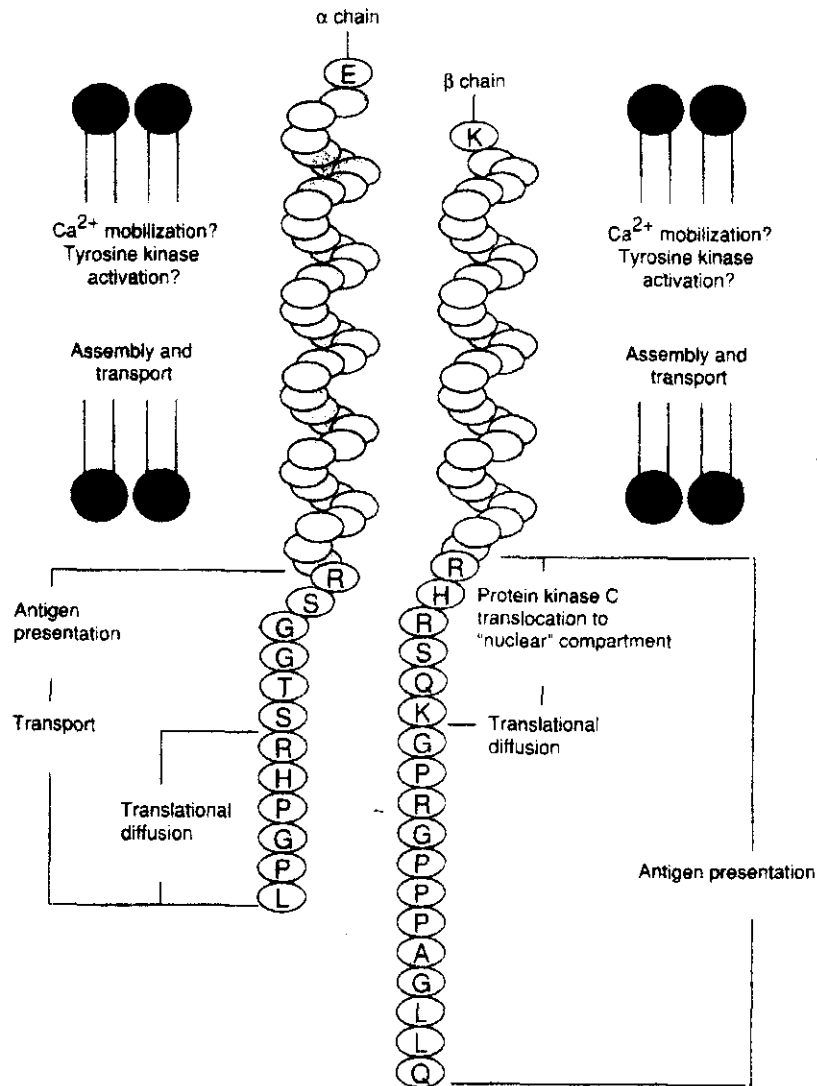


Figura 42.-Asignación de funciones a los dominios citoplásmico y transmembrana de las moléculas de clase II (en este caso de ratón), basado en el análisis mutacional de los mismos. Tomado de Wade y cols. (1993).

Una alternativa diferente podría ser que un procesamiento distinto del RNAm produzca unas moléculas de DPw2 no funcionales. Senju y cols. (1992) describen que la cadena β de DQ presenta de forma natural una variante que posee un dominio citoplásmico más corto debido a un procesamiento alternativo del RNAm. Las células que poseen moléculas de DQ producidas con esta cadena presentan antígeno peor que una células con la cadena β "normal".

Los resultados de experimentos en los cuales moléculas de clase II fueron analizadas en su capacidad de presentar Ag demostraron que casi

todos los CTLs probados eran incapaces de responder ante moléculas de clase II con variaciones en los aminoácidos de los dominios citoplásmicos (Wade y cols., 1993). La función de las moléculas de clase II en las respuestas inmunitarias mediadas por Ag sería algo más que el de una estructura de reconocimiento pasiva necesaria para la activación de los linfocitos T. El análisis mutacional de las moléculas de clase II (Wade y cols., 1993) indica que existe una compartimentalización funcional dentro de las mismas. Mientras la zona N-terminal de la molécula se dedica a la unión y presentación del péptido, los dominios transmembrana y citoplásmicos de la molécula tiene varias funciones. Desde la expresión normal de las moléculas de clase II en superficie (Cosson y Bonaficino, 1992), pasando por la transducción de señales hasta las interacciones con otras moléculas en la membrana plasmática (Wade y cols., 1993). La importancia de los dominios citoplásmicos en la presentación de Ag está demostrado por estudios con linfocitos B que expresan moléculas de clase II con estos dominios truncados. Estas células fallan en la presentación del Ag a un porcentaje elevado de las células T probadas.

Aún más, moléculas quimera con los dominios citoplásmicos y transmembrana de clase I y el dominio extracelular de clase II, probadas en su capacidad de presentación de Ag, eran entre 10 y 100 veces menos eficientes en esta presentación (Kjer-Nielsen y cols., 1990) .

¿Podemos pensar que la mutación que presentan 721.EM1, 721.EM2 y 721.EM6 es la misma pero en diferente gradación o intensidad? ¿Son 721.EM1 y 721.EM2 la misma línea, es decir presentan la misma mutación? De cualquier forma, la mutación sólo afecta a un alelo de DP, por lo tanto, son factores alelos específicos los afectados, como en el caso descrito para DQ.

Podríamos pensar que las moléculas expresadas en superficie por las líneas diploides 721.EM1 y 721.EM2, son moléculas que no presentan péptido, es decir están vacías. Según Mellins y cols. (1991), la reducción en el reconocimiento por parte de AcM anti-DR3 en un mutante afectado en procesamiento antigénico era debida a la presencia de un menor número de

dímeros de DR3 en superficie debido a la no unión de péptido y al producirse moléculas inestables que alcanzaban en menor número la superficie para ser inmediatamente endocitadas y destruidas.

Aparentemente, la redundancia de los genes es un hecho dentro de la región de la respuesta inmune del MHC. Varios genes de estructura similar pueden haber evolucionado como salvaguarda contra las mutaciones de estos genes vitales. Esta visión implicaría que las diferentes isotipos de las moléculas de clase II tienen una función idéntica e intercambiable. De hecho, ratones sin moléculas I-E son inmunocompetentes. La producción de moléculas de clase II de otras especies en el ratón produce la generación de clones de linfocitos T restringidos para las nuevas moléculas de clase II. Otra alternativa sería la existencia de diferentes funciones para los distintos isotipos de las moléculas de clase II. Por ejemplo, se ha propuesto que las moléculas de HLA-DQ juegan un papel importante en la respuesta de las células T frente a Ag de la pared de estreptococos. La evidencia de la diferente regulación de los genes de clase II proporciona más razones para considerar la posibilidad de que los distintos isotipos de moléculas de clase II realicen funciones diferentes

VI.CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. 45.EM3 y 45.EM15 son las únicas LCLs mutantes haploides que presentan mRNA para las dos cadenas de las moléculas de HLA-DP, el resto de las LCLs se distribuye de la siguiente forma:
2. Expresan sólo cadena α : 45.EM1, 45.EM2, 45.EM5, 45.EM7, 45.EM8, 45.EM9, 45.EM13 y 45.EM16.
3. Expresan sólo cadena β : 45.EM11 y 45.EM18.
4. No expresa ninguna: 45.EM14.
5. El análisis densitométrico del Northern muestra que las LCLs estudiadas se diferencian entre sí por la distinta expresión de los RNAm para cada cadena de las moléculas de HLA-DP, lo que demuestra que presentan diferente regulación e *implica, a su vez, que se trata de LCLs mutantes distintas.*
6. Ninguna de las LCLs estudiadas defectivas en la expresión de HLA-DP es capaz de recuperar el fenotipo parental por acción del IFN- γ , ni de la IL-4. Sí se modula la expresión de HLA-DR y HLA-DQ
7. De la fusión de las LCLs haploides con la línea 180, se puede concluir que hay líneas afectadas en secuencias reguladoras en *cis* y líneas afectadas en factores de regulación en *trans*.
8. Se ha podido establecer un grupo de complementación entre las LCLs mutantes haploides, compuesto por las LCLs 45.EM1, 45.EM2 y 45.EM5. Por otra parte, se ha comprobado que 45.EM9 y la línea mutante defectiva para la expresión de clase II SJO, pertenecen al mismo grupo de complementación.

9. El estudio de las secuencias promotoras comunes para los distintos genes de clase II de los mutantes afectados en *cis* mostró que ninguna de ellas presentaba cambios en su secuencia.
10. De las líneas haploides estudiadas sólo dos expresan moléculas de HLA-DP en citoplasma: 45.EM3 y 45.EM15.
11. De los resultados obtenidos con la línea 45.EM3 (negativa en superficie para DP, positiva en citoplasma para DP, expresión de mRNA para ambas cadenas y no presentar ningún fallo de secuencia en los genes estructurales para HLA-DP) se deduce que puede estar afectado en el procesamiento antigénico específico para péptidos presentados por HLA-DP o en la vía de transporte de las moléculas de este locus hacia la superficie celular.
12. El estudio del defecto de la LCL 45.EM15, muestra que esta línea tiene alterado un factor de procesamiento antigénico específico de HLA-DPw2
13. La LCL mutante diploide 721.EM5 tiene un defecto de procesamiento de antígeno que afecta al reconocimiento por parte de las CTLs DPw2 específicas.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- ACCOLLA, R.S., ADORINI, L., SARTORIS, S., SINIGAGLIA, F., GUARDIOLA, J. (1995).** "MHC: orchestrating the immune response", *Immunol. Today* 16: 8-11.
- ACHA-ORBEA, H., MITCHEL, D.J., TIMMERMAN, L., WRAITH, D.C., TAUSCH, G.S., WALDOR, M.K., SAMVIL, S.S., MCDEVITT, H.O. Y STEINMAN, L. (1988).** "Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelites allows specific immune intervention", *Cell* 54: 263-273.
- AJITKUMAR, P., GEIER, S.S., KESARI, K.V., BORRIELLO, F., NAKAGAWA, M., BLUESTONE, J.A., SAPER, M.A., WILEY, D.C. Y NATHENSON, S.G. (1988).** "Evidence that multiple residues on both the alpha-helices of the class I MHC molecule are simultaneously recognized by the T cell receptor", *Cell* 54: 47-56.
- AMALDI, I., REITH, W., BERTE, C. Y MACH, B. (1989).** "Induction of HLA class II genes by IFN-gamma is transcriptional and requires a trans-acting protein", *J. Immunol.* 142: 999-1004.
- ANDERSON, P., MORIMOTO, C., BREITMEYER, J.B. Y SCHLOSSMAN, S.F. (1988).** "Regulatory interactions between members of the immunoglobulin superfamily", *Immunol. Today* 9: 199-203.
- ARNOLD, D., DRISCOLL, J., ANDROLEWICZ, M., HUGHES, E., CRESSWELL, P. Y SPIES, T. (1992).** "Proteasome subunits encoded in the MHC are not generally required for the processing of peptides bound by MHC class I molecules". *Nature* 360: 171-174.
- ANDERSEN, L.CH., BEATY, J.S., NETTLES, J.W. (1991).** "Allelic polymorphism in transcriptional regulatory regions of HLA-DQB genes". *J. Exp. Med.* 173: 181-192.
- ARROYO, J., DIEZ-OREJAS, R., ALVAREZ, A.M., SHAW, S. Y SANCHEZ-PEREZ, M. (1994).** "Molecular analysis of an HLA-DP mutant cell line selected for its resistance to killing by HLA-DPw2-specific T-cell clones". *Immunogenetics* 39: 40-47.
- ASHWELL, J. D., CHEN, C. Y SCHWARTZ, R. M. (1986).** "High frequency and nonrandom distributions of alloreactivity in T cell clones selected for recognition of foreign antigen in association with self class II molecules", *J. Immunol* 136: 389-395.
- AUFFRAY, C., Y STROMINGER, J.L. (1986).** "Molecular genetics of the human major histocompatibility complex", *Adv. Hum. Genet* 15: 197-247.
- AUSTIN, P., TROWSDALE, J., RUDD, C., BODMER, W., FELDMANN, M., Y LAMB, J. (1985).** "Functional expression of HLA-DP genes transfected into mouse fibroblasts". *Nature* 313: 61.
- BABBITT, B. P., ALLEN, P. M., MATSUEDA, G., HABER, E. Y UNANUE, E. R. (1985).** "Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules". *Nature* 317: 359- 361.
- BACH, F.H., GRONER, J. AWATSON, A.J., REINSMOEN, N. Y SEGALL, M. (1985).** "HLA class II molecules: T cell responses and molecular characterization",
- BAKKE, O. Y DOBBERSTEIN, B. (1990).** "MHC class II-associated Invariant chain contains a sorting signal for Endosomal compartments", *Cell* 63:707-716
- BARBOSA, J.A., SANTOS-AGUADO, J., MENTZER, S.J., STROMINGER, J.L., BURAKOFF, S.J. Y BIRO, P.A. (1987).** "Role of glycosilation in surface expression and functional recognition". *J. Exp. Med.* 166: 1329-1350.
- BASTA, P.V., SHERMAN, P.A. Y TING, J. P.-Y. (1988).** "Detailed delineation of an interferon-gamma responsive element important in human HLA-DRA gene expression in a glioblastoma multiform line", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 8618-8622.

- BAUMHÜTER, S., FASEL, N., CORRADIN, G. Y GUARDIOLA, J. (1987).** "T cell receptor beta chain gene rearrangements and V-Beta gene usage in horse cytochrome C-specific T cell hybridomas". *Eur. J. Immunol.* 17: 657-661.
- BAYER, E.A. Y WILCHEK, M. (1978).** "The avidin-biotin complex as a tool in molecular biology". *Trends in Biochemical Sciences* 20: 257-259.
- BELL, J.I., DENNY, D.W. JR Y MC. DEVITT, H.O. (1980).** "Structure and polymorphism of murine and human class II major histocompatibility antigens", *Immunol. Rev.* 85: 45-86.
- BENACERRAF, B. (1981).** "Role of MHC gene products in immune regulation". *Science* 212: 1229.
- BÉNAROCHE, P., YILLA, M., RAPOSO, G., ITO, K., MIWA, K., GEUZE, H.J. Y PLOEGH, H.L. (1995)** How MHC class II molecules reach the endocytic pathway, *EMBO J.* 14: 37-48
- BÉNICHOU, B. Y STROMINGER, J.L. (1991).** Class II-antigen-negative patient and mutant B-cell lines represent at least three, and probably four, distinct genetic defects defined by complementation analysis. *PNAS USA* 88: 4285-4288
- BENOIST, C. Y MATHIS, D. (1990).** "Regulation of major histocompatibility complex class II genes: X, Y and other letters of the alphabet", *Annu. Rev. Immunol.* 8: 681-715.
- BEVAN, J. M. (1984).** "High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity", *Immunol. Today* 5: 128-130.
- BEVAN, M.J. (1987).** Class discrimination in the world of immunology". *Nature (London)*. 325: 192-194.
- BIDDISON, W.E., RAO, P.E., TALLE, M.A., GOLDSTEIN, G., Y SHAW, S. (1982).** "Possible involvement of the OKT4 molecule in T cell recognition of class II HLA antigens: evidence from studies of cytotoxic lymphocytes specific for SB antigens", *J. Exp. Med.* 156: 1065-1076.
- BIDDISON, W.E., RAO, P.E., TALLE, M.A., GOLDSTEIN, G. Y SHAW, S.J. (1984).** *J. Exp. Med.* 159: 783-797.
- BIKOFF, E.K. (1991).** "Class II restricted EgCr2'ab-specific T cell recognize a signal minus form of the J-CH3b antigen". *Eur. J. Immunol.* 17: 255.
- BIKOFF, E.K., HUANG, L.Y., EPISKOPOU, V., VAN MEERWIJK, J., GERMAIN, R.N. Y ROBERTSON, E.J. (1993).** "Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4⁺ T cell selection in mice lacking invariant chain expression". *J. Exp. Med.* 177: 1699-1712.
- BJORKMAN, P.J. (1984).** Thesis. Harvard University.
- BJORKMAN, P.J., SAPER, M.A., SAMRAOUI, B., BENNETT, W.S., STROMINGER, J.L. Y WILEY, D.C. (1987a).** "Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2", *Nature* 329: 506-512.
- BJORKMAN, P. J., SAPER, M.A., SAMRAOUI, B., BENNETT, W.S., STROMINGER, J.L. Y WILEY, D.C. (1987b).** "The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens", *Nature* 329: 512-518.
- BJORKMAN, P. Y PARHAM, P. (1990).** "Structure, function and diversity of class I major histocompatibility complex molecules". *Annu. Rev. Biochem.* 59: 253.
- BLACKMAN, M.A., KAPPLER, J.W. Y MARRACK, P. (1988).** "T-cell specificity and repertoire". *Immunol. Rev.* 101: 5-19.

- BLANAR, M.A., BOETTGER, E.C. Y FLAVELL, R.A.. (1988).** "Transcriptional activation of HLA-DR α by interferon-gamma requires a trans-acting protein". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4672-4676.
- BLUM, J.S. Y CRESSWELL, P. (1988).** "Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3975-3979.
- BODMER, W.F., ALBERT, E., BODMER, J.G., DAUSSET, J., KISSMEYER-NIELSEN, F., PAYNE, R., VAN ROOD, J.J., TRNKA, Z., Y WALFORD, R.L. (1984).** "Nomenclature for factors of the HLA system". *Hum Immunol* 11: 117-125.
- BODMER, J., Y BODMER, W. (1984).** "Histocompatibility Testing". *Immunol Today* 5: 251-254.
- BODMER, J., BODMER, W., HEYES, J., SO, A., TONKS, S., TROWSDALE, J., Y YOUNG, J. (1987).** "Identification of HLA-DP polymorphism with DP- α and DP- β probes and monoclonal antibodies. Correlation with primed lymphocyte typing". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 4596-4600.
- BOGEN, B., MALISSEN, B. Y HAAS, W. (1986).** "Idiotipe-specific T cell clones that recognize syngeneic immunoglobulin fragments in the context of class II molecules". *Eur. J. Immunol.* 16: 1373-1378.
- BOLE, D.G., HENDERSHOT, L.M. Y KEARNEY, J.F. (1986).** "Posttranslational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in non secreting and secreting hybridomas". *J. CELLBiol.* 102: 1558-1566.
- BONNEROT, C., MARKS, M.S., COSSON, P., ROBERTSON, E.J., BIKOFF, E.K., GERMAIN, R.N. Y BONIFACINO, J.S. (1994).** "Association with BIP and aggregation of class II molecules synthesized in the absence of invariant chain". *EMBO J.* 13: 934-944.
- BOURGUE, F., CHARMOT, D., MERCIER, P., TONGIO, MM., SHAW, S. Y MAWAS, C. (1982).** "HLA-SB in the south of France. Correlation between locally derived and reference typing reagents". *Tissue Antigens* 20: 254-259.
- BRACIALE, T.J., MORRISON, L.A., SWEETSER, M.T., SAMBROOK, J., GETHING, M.J. Y BRACIALE, V.L. (1987).** Antigen presentation pathways to class I and class II MHC-restricted T lymphocytes". *Immunol. Rev.* 88: 95-114.
- BRACIALE, T.J., Y BRACIALE, V.L. (1991).** "Antigen presentation: structural themes and functional variations". *Immunol. Today* 12: 124-129.
- BRADFORD, M. (1976).** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.* 72: 248.
- BRODSKY, F. Y PARHAM, P. (1980).** "Monoclonal antibodies to HLA-DR α determinants". *Tissue Antigens* 16: 30.
- BRODSKY, A. Y GUAGLIARDI, L.E. (1991).** "The cell biology of antigen processing and presentation". *Annual Review of Immunology* 707-744.
- BROOKS, A., HARTLEY, S., SJER-NIELSEN, L., PEREIRA, J., GOODNOW, C.C., BASTEN A. Y MACCLUSNEY, J. (1990).** "Class II restricted presentation of an endogenously derived immunodominant T- cell determinant of hen egg lysozyme". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3290-3294.
- BROWN, J., JARDETZKY, T., SAPER, M., SAMRAOUI, B., BJORKMAN, P Y WILEY, D. (1988).** "A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules". *Nature* 332: 845-848.
- BROWN, K M.G., DRISCOLL, J. Y MONACO J.J. (1991).** "Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes". *Nature* 353: 355-357

- GOODFELLOW, P.N., JONES, E.A., VAN HEYNENGEN, V., SOLOMON, E., BOBROW, M., MIGGIANO, V. Y BODMER, W.F. (1975). "The beta 2- microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HLA region", *Nature* 254: 267-268.
- GORER, P.A. (1937). "The antigenic basis of tumor Transplantation", *J. Pathol. Bacteriol.* 44: 691-697.
- GORSKI, J., ROLLINI, P., LONG, E., Y MACH, B. (1984). "Molecular organization of the HLA-SB region of the human major histocompatibility complex and evidence for two SB beta chain genes", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 3934-3938.
- GRAVALLESE, E.M., BOOTHBY, M.R., SMAS, C. Y GLIMCHER, L.H. (1989). "A lipopolysaccharide-induced DNA-binding protein in B cells is distinct from NF- κ B", *Mol. Cell. Biol.* 9: 3184-3192.
- GREY, H.M., KUBO, R.T., COLON, S.M., POULIK, M.D., CRESSWELL, P., SPRINGER, T.A., TURNER, M. Y STROMINGER, J.L. (1973). "The small subunit of HLA antigens is beta 2-microglobulin", *J. Exp. Med.* 138: 1608-1612.
- GRIFITHS, G., HOFFACK, B., SIMONS, K., MELLMAN, I. Y KORNFELD, S. (1988). "The manose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes", *Cell* 52: 329-341.
- GUAGLIARDI, L. E., KOPPELMAN, B., BLUM, J. S., MARKS, M. S., CRESSWELL, P. Y BRODSKY, F. M. (1990). "Colocalization of molecules involved in antigen processing and presentation in an early endocytic compartment", *Nature*, 343: 133-139.
- GUO, H.C., MADDEN, D.R., SILVER, M.L., JARDETZKY, T.S., GORGA, J.C., STROMINGER, J.L. Y WILEY, D.C. (1993). "Comparison of the P2 specificity pocket in three human histocompatibility antigens: HLA-A*0201, and HLA-B*2705". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 8053-8057.
- GUSTAFSSON, K., EMMOTH, E., WIDMARK, E., BOHME, J., PETERSON, P.A., Y RASK, L. (1984). "Isolation of a cDNA clone coding for an SB beta chain", *Nature* 309: 76-78 (1984)
- GUSTAFSSON, K., WIDMARK, E., JONSSON, A.K., SERVENIUS, B., SACHS, D., LARHAMMAR, D., RASK, L. Y PETERSON, P.A. (1987). "Class II genes of the human major histocompatibility complex. Evolution of the DP region as deduced from nucleotide sequences of the four genes", *J. Biol. Chem.* 262: 8778-8786.
- HAMMERLING, G Y MORENO J. (1990). "The function of the invariant chain in antigen presentation by MHC class II molecules", *Immunol. Today* 11: 337-340.
- HANAHAN, D. (1985). "Techniques for transformation of *E. Coli*". En "DNA cloning". vol. I: 12 (Glover. D.M ed.). IRL Press, Oxford, England.
- HANSEN, T.H., CARRENO, B.M. Y SACHS, D. (1993). The Major Histocompatibility Complex. En: *Fundamental Immunology*, 3^o ed. Editado por: Paul, W.E., Raven Press, 653. New York.
- HARDING, C.V., ROOF, R.W. Y UNANUE, E.R. (1989). "Turnover of Ia peptide complexes if facilitated in viable antigen-presenting cells: biosynthetic turnover of Ia vs. peptide exchange". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 4230-4234.
- HARDING, C.V., COLLINS, D.S., SLOT, J.V., GEUZE, H.J. Y UNANUE, E.R. (1991). "Liposome-encapsulated antigens are processed in lysosomes, recycled, and presented to T-cells". *Cell* 64: 393-401.
- HARDING, C.V. Y GEUZE, H.J. (1992). "Class II MHC molecules are present in macrophage lysosomes and phagolysosomes that function in the phagocytic processing of *Listeria monocytogenes* for presentation to T cells". *Cell. Biol.* 119: 531-542.

- HEATH, W.R., HURS, M.E., CARBONE, F.R. Y SHERMAN, L.A. (1989). "Peptide-dependent recognition of H-2K^b by alloreactive cytotoxic T lymphocytes". *Nature* 341: 749-752.
- HEATH, W.R., KANE, K.P., MESCHER, M.F. Y SHERMAN, L.A. (1991). "Alloreactive T cells discriminate among a diverse set of endogenous peptides". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 5101-5105.
- HEITZMANN, H. Y RICHARDS, F.M. (1974). "Use of the avidin-biotin complex for specific staining of biological membranes in electron microscopy". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71: 3537-3541.
- HEMPERLY, J.J., MURRAY, B.A., EDELMAN, G.M. Y CUNNINGHAM, .A. (1986). "Sequence of a cDNA clone encoding the polysialic acid-rich and cytoplasmic domains of the neural cell adhesion molecule N-CAM". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 3037-3041.
- HENKES, W., SYHA, J. Y RESKE, K. (1988). "Nucleotide sequence of rat invariant gamma chain cDNA clone pLRg34.3". *Nucl. Acid. Res.* 16: 11.822-11.826.
- HEYES, J., AUSTIN, P., BODMER, J., BODMER, W., MADRIGAL, A., MAZZILLI, M.C. Y TROWSDALE, (1986). "Monoclonal antibodies to HLA-DP transfected mouse L cells". *J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 3417-3421.
- HEYES et al. Workshop.
- HILDEMAN, W.H. (1979). "Immunocompetence and allogeneic polymorphism among invertebrates". *Transplantation* 27: 1-3.
- HITZEL, C., VAN ENDERT, P Y KOCH, N. (1995) Acquisition of peptides by MHC class II polypeptides in the absence of the invariant chain, *J Immunol* 154:1048-1056
- HOLMES, N. (1989). "New HLA class I molecules", *Immunol. Today* 10: 52-53.
- HOGAN, S.T., SHIMOJO, N., WALK, S.F., ENGELHARD, V.H., MALOY, W.L., COLIGAN, J.E. Y BIDDISON, W.E. (1988). "Mutations in the alpha two helix of HLA-A2 affect presentation but do not inhibit binding of influenza virus matrix peptide". *J. Exp Med.* 168: 725-736.
- HOOD, L., KRONENBERG, M. Y HUNKAPILLER, T. (1985). "T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family", *Cell* 40: 225-229.
- HOUGHTON, A.N., THOMSON, T.M., GROSS, D., OETTGEN, H.F. Y OLD, L.J. (1984). "Surface antigens of melanoma and melanocytes", *J. Exp. Med.* 160: 255-269.
- HUBBARD, A. L. (1989). "Endocytosis", *Curr. Opin. Cell Biol.* 1:675-683.
- HUNKAPILLER, T. Y HOOD, L. (1986). "The growing immunoglobulin gene superfamily", *Nature* 323: 15-16.
-
- HUNT, D.F., HENDERSON, R.A., SHABANOWITZ, J., SAKAGUCHI, K., MICHEL, H., SEVILIR, N., COX, A.L., APPELLA, E. Y ENGELHARD, V.H. (1992a). "Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry". *Science* 255: 1261-1263.
- HUNT, D.F., MICHEL, H., DICKINSON, T.A., SHABANOWITZ, J., COX, A.L., SAKAGUCHI, K., APPELLA, E., GREY, H.M. Y SETTE, A. (1992b). "Peptides Presented to the Immune System by the Murine Class II Major Histocompatibility Complex molecule I-A^d". *Science* 256: 1817.
- HURLEY, C.K., SHAW, S., NADLER, L., SCHLOSSMAN, S., Y CAPRA, J.D. (1982). "The alpha and beta chains of SB and DR antigens are structurally distinct", *J. Exp. Med.* 156:1557-1562.

- INOKO, H., ANDO, A., KIMURA, M., OGATA, TSUJI, K. (1984). Isolation and characterization of the cDNA clones and the genomic clones of the HLA class II antigen heavy chains. In: Baur MP, Albert ED, Mayr WR (eds) *Histocompatibility testing 1984*. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, pp 559- 564.
- INOKO, H., ANDO, A., KIMURA, M., OGATA, S., Y TSUJI, K. (1985). "Isolation and characterization of the cDNA clones and genomic clones of the HLA-SB antigen heavy chain", *J. Immunol.* 135: 2156-59.
- IVASHKIV, L.B., LIOU, H-C., KARA, C., LAMPH, W.W., VERMA, I.M. Y GLIMCHER, L.H. (1990). "MXBP/CRE-BP"2 and c-Jun form a complex which binds to the cyclic AMP, but not to the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, response element", *Mol. Cell. Biol.* 10: 1609-1621.
- JACOBSON, S., SEKALY, R. P., JACOBSON, C. L., MC FARLAND, H. F. Y LONG, E. O. (1989). "HLA class II-restricted presentation of cytoplasmic measles virus antigens to cytotoxic T cells", *J. virol.* 63: 1756-1762.
- JARAQUEMADA, D., MARTI, M. Y LONG, E.O. (1990). "An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cell for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells". *J. Exp. Med.* 172: 947-954.
- JARAQUEMADA, D. Y MARTI, M. (1991). "Presentación de antígeno a células T: diferentes vías de procesamiento para moléculas de clase I clase II del complejo principal de histocompatibilidad". *Inmunología* 10: 109-117.
- JARDETZKY, T., LANE, W., ROBINSON, R.A., MADDEN, D. Y WILEY, D.C. (1991). *Nature* 353: 326-329.
- JENSEN, P. E. (1990). "Regulation of antigen presentation by acidic pH", *J. Exp. Med.* 171: 1779-1784.
- JERNE, N. (1971). "The somatic generation of immune recognition", *Eur. J. Immunol.* 1: 1-9.
- JIN, J., SHIH, W.K. Y BERKOWER, I. (1988). "Human T cell response to the surface antigen of hepatitis B virus (HBsAg). Endosomal and nonendosomal processing pathways are accessible to both endogenous and exogenous antigen". *J. Exp. Med.* 168: 293-306.
- JOHNSON, A.K., HYLDING-NIELSEN, J.J., SERVENIUS, B., LARHAMMAR, D., ANDERSSON, G., JORGENSEN, F., PETERSON, P.A., Y RASK, L. (1987). "Class I genes of the human major histocompatibility complex. Comparisons of the DQ and DX genes", *J. Biol. Chem.* 262: 8767-8777.
- JOHNSON, A.H., HURLEY, C.K., HARTZMAN, R.J., ALPER, C.A. Y LEWIS, E.J. (1991). En: *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. Editado por: Henry J.B. Philadelphia: WS Saunders Co, 761.
- JONES, P.P., MURPHY, D.B., HEWGILL, D. Y McDEVITT, H.O. (1978). "Detection of a common polypeptide chain in I-A and I-E subregion immunoprecipitates". *Mol. Immunol.* 16: 51-60.
- JORDAN, B.R., CAILLOL, D., DAMOTTE, M., DELOVITCH, T., FERRIER, P., KAHN-PERLES, B., KOURILSKY, F., LAYET, C., BOUTELLIER, P., LEMONNIER, F.A., MALISSEN, M., N'GUYEN, C., SIRE, J., SODOYER, R., STRACHAN, T. Y TRUCY, J. (1985). "HLA class I genes: from structure to expression, serology and function", *Immunol. Rev.* 84: 73-92.
- KANNELLOPOULOS, J.M., WIGGLESWORTH, N.M., OWEN, M.J. Y CRUMPTON, M.J. (1983). Biosynthesis and molecular nature of the T3 antigen of human T lymphocytes. *EMBO J.* 2: 1807-1814.
- KAPPES, D.J., ARNOT, D., OKADA, K., Y STROMINGER, J.L. (1984). "Structure and polymorphism of the HLA class II SB light chain genes" *EMBO J.* 3: 2985-2993.

- KATZ, D.H., HAMAOKA, T. Y BENACERRAF, B. (1973). "Cell interactions between histocompatible T and B lymphocytes. Failure of physiologic cooperative interactions between T and B lymphocytes from allogeneic donor strains in humoral response to hapten-protein conjugates", *J. Exp. Med.* 137: 1405-1418.
- KAUFMAN, J.F., AUFRAY, C., KORMAN, A.J., SHACKELFORD, D.A. Y STROMINGER, J.L. (1984). "The class II molecules of the human and murine Major Histocompatibility Complex" *Cell*. 36: 1-13.
- KAVATHAS, P., BACH, F.H. Y DE MARS, R. (1980). "Gamma-ray induced loss of expresion of HLA and glyoxalose I alleles in lymphoblastoid cells". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 4251-4255.
- KAYE, J. Y JANEWAY, C. A. (1984). "The Fab fragment of a directly activating monoclonal antibody that precipitaates a disulphide-bonded heterodimer from a helper T cell clone blocks activation by either allogeneic Ia or antigen and self Ia", *J. Exp. Med.* 159: 1397-1412.
- KELLY, A.P., MONACO, J.J., CHO, S. Y TROWSDALE, J. (1991a). "A new human HLA class II-related locus, DM". *Nature* 353: 571-573.
- KELLY, A.P., POWIS, S.H., RADLEY, E., BECK, S. Y TROWSDALE, J.A. (1991b). "Second proteasome-related gene in the human MHC class II region". *Nature* 353: 667-668.
- KERN, M.J., STUART, P.M., OMER, K.W. Y WOODWARD, J.G. (1989). "Evidence that IFN-gamma does not affect MHC class II gene expression at the post.transcriptional level in a mouse macrophage cell line", *Immunogenetics* 30: 258-265.
- KLEIJMEER, M.J., KELLY, A., GEUZE, H.J., SLOT, J.W., TOWNSEND, A. Y TROWSDALE, J. (1992). "Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi". *Nature* 357: 342-344.
- KIMBALL, E.S. Y COLIGAN, J.E. (1983). "Structure of class I major histocompatibility antigens", *Contemp. Top. Mol. Immunol.* 9: 1-63.
- KING, D.P. Y JONES, P.P. (1983). "Induction of Ia and H-2 antigens on a macrophage cell line by immune interferon", *J. Immunol.* 131: 315-318.
- KOBR, M., REITH, W., HERRERO-SANCHEZ, C. Y MACH, B. (1990). "Two DNA-binding proteins discriminate between the promoters of different members of the major histocompatibility complex class II multigene family", *Mol. Cell. Biol.* 10: 965-971.
- KOCH, G.L.E. Y SMITH, M.J. (1978). "An association between actin and the major histocompatibility antigen H-2", *Nature* 273: 274-278.
- KOERNER, T.J., HAMILTON, T.A. Y ADAMS, D.O. (1987). "Suppressed expression of surface Ia on macrophages by lipopolysaccharide: evidence for regulation at the level of accumulation of mRNA", *J. Immunol.* 139: 239-243.
- KOLLER, B.H., GERAGHTY, D.E., DE MARS, R., DUVICK, L., RICH, S. Y ORR, H.T. (1989). "Chromosomal organization of the human major histocompatibility complex class I gene family", *J. Exp. Med.* 169: 469-480.
- KOPPELMAN, B. Y CRESWELL, P. (1990). "Rapid non-lysosomal degradation of assembled HLA class II glycoproteins incorporating a mutant DR-alfa chain". *J. Immunol.* 145: 2730-2736.
- KORMAN, A.J., BOSS, J.M., SPIES, T., SORENTINO, R., OKADA, K. Y STROMINGER, J.L. (1985). "Genetic complexity and expression of human class II histocompatibility antigens", *Immunol. Rev.* 85: 45-86.

- KOURILSKY, P. Y CLAVERIE, J. M. (1986). "The peptidic self model: a hypothesis on the molecular nature of the immunological self", *Ann. Inst. Pasteur* 137D: 3-21.
- KOURILSKY, P. Y CLAVERIE, J. M. (1989). "MHC-antigen interaction: What does the T cell receptor see?", *Adv. in Immunol.* 45:107-193.
- KRONENBERG, M., SIN, G., GOOD, L. E. Y SHASTRI, N. (1986). The molecular genetics of the T cell antigen receptor and T cell recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 4: 529-591.
- KUNKEL, T.A., ROBERTS, J.D. Y ZABOUR, R.A. (1987). *Methods Enzymol.* 154: 367-382
- LAEMMLI, U.K. (1979). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature* 227: 680-685.
- LAMB, C.A., YEWEDELL, J.W., BENNINK, J.R. Y CRESSWELL, P. (1991). "Invariant chain targets HLA class II molecules to acidic endosomes containing internalized influenza virus", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5998-6002.
- LAMPSON, L.A. Y LEVY, R. (1980). "Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line", *J. Immunol.* 125: 293-295.
- LANCET, D., PARHAM, P. Y STROMINGER, J.L. (1979). "Heavy chain of HLA-A and HLA-B antigens is conformationally labile: a possible role for beta 2-microglobulin", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 3844-3848.
- LANZAVECCHIA, A. (1990). "Receptor mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II restricted T lymphocytes". *Ann. Rev. Immunol.* 8: 773-93.
- LATRON, F., JOTTERAND-BELLOMO, M., MAFFEI, A., SCARPELLINO, L, BERNARD, M., STROMINGER, J.L. Y ACOLLA, R.S. (1998). "Active suppression of major histocompatibility complex class II gene expression during differentiation from B cells to plasma cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 2229-33
- LEE, J. M. Y WATTS, T. M. (1990). "On the dissociation and reassociation of MHC classII foreign peptide complexes: evidence that brief transit through an acidic compartment is not sufficient for binding site regeneration", *J. Immunol.* 144: 1829-1834.
- LERACH, H., DIAMOND, D., WOZNEY, J.M. Y BOEDTKER, H. (1977). "RNA weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination". *Biochemistry* 16: 4743-4746.
- LEVINE, L.S., ZACHMANN, M., NEW, M.J., PRADER, A., POLLACK, M.S., O'NEILL, G.J., YANG, S.Y., OBERFIELD, S. Y DUPONT, B. (1978). "Genetics mapping of the 21-hydroxylase deficiency gene within the HLA linkage group", *N. Engl. J. Med.* 299: 911-915.
- LEW, A.M., LILLEHOJ, E.P., COWAN, E.P., MALOY, W.L., VAN SCHRAVENDUK, M.R. Y COLIGAN, J.E. (1986). "Class I genes and molecules: an update", *Immunology* 57: 3-18.
- LINCH, D.C., NADLER, L.M., LUTHER, E.A., Y LIPTON, J.M. (1984). "Discordant expression of human Ia-like antigens on hematopoietic progenitor cells", *J. Immunol.* 132: 2324-2329.
- LINNER, K.M., Y BACH, F.H. (1984). "HLA-FA: a non-DR, non-DQ HLA class II product", In: Baur, M.P., Albert, E.D., Mayr, W.D. (eds) *Histocompatibility Testing*. Springer, Berlin Heidelberg. New York Tokyo, pp 538-539.
- LIU, H-C., BOOTHBY, M.R., FINN, P.W., DAVIDON, R., NABAVI, N., ZELEZNIK-LE, N.J., TING, J. P-L. Y GLIMCHER, L.H. (1990). "A new member of the leucine zipper class of proteins that binds to the HLA-DRA promoter", *Science* 247: 1581-1584.
- LIU, H-C., EDDY, R., SHOWS, T., LISOWSKA-GROSPIERRE, B., GRISCELLI, C., DOYLE, C., MANNHALTER, J., EIBL, Y GLIMCHER, L.H. (1991). "An HLA-DRA promoter DNA-

- binding protein is ubiquitously and maps to human chromosomes 22 and 5", Immunogenetics.
- LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., YUAN, L.C. Y TIPPER, C. (1991).** "Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TNG suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic". *Cell* 67: 601-616.
- LISOWSKA-GROSSPIERRE, B., FONDANECHÉ, M., ROLS, MP. GRISSEELLI, C., Y FISHER, A. (1994)** Two complementation groups account for most cases of inherited MHC class II deficiency, *Hum. Mol. Genet.* 3: 953-958.
- LITTMAN, D.R., THOMAS, Y., MADDON, P.J., CHESS, L. Y AXEL, R. (1985).** "The isolation and sequence of the gene encoding T8: A molecule defining functional classes of T lymphocytes ", *Cell* 40: 237-246.
- LJUNGGREN, H. G., SLAM, N. J., OHLEN, C., NEEFJES, J. J., HOGLUND, P., HEEMELS, M. T., BASTIN, J., SCHUMACHER, T., TOWNSEND, A., KARRE, K Y PLOEGH, H. L. (1990).** "Empty MHC class I molecules come out in the cold", *Nature* 346: 476-480.
- LLOYD, J Y FOSTER, S. (1986).** "The lysosome membrane", *Trends. Biochem. Sci.* 11: 365-368.
- LONG, E.O., ROSEN-BRONSON, S., JACOBSON, S., Y SEKALY, R.P. (1989).** "Isotype diversity and function of HLA class II anti- gens". In *Molecular Biology of HLA class II antigens*. ed. by Silver CRC Press, Boca Raton.
- LONG, E.O., ROSEN-BRONSON, D.R., KARP, D., MALNATI, M, SEKALY, R.P., Y JARAQUEMADA, D. (1991).** "Efficient cDNA expression vectors for stable and transient expression of HLA-DR in transfected fibroblast and limphoid cells", *Human Immunology* 31: 229-235.
- LORENZ, R. G. Y ALLEN, P. M. (1988).** "Direct evidence for functional self-protein/ Ia molecule complexes "in vivo", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5220-5223.
- LOTTEAU, V., TEYTON, L., PELERAUX, A., NILSON, T., KARLSSON, L., SCHMID, S., QUARANTA, V. Y PETERSON, P.A. (1990).** "Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain", *Nature* 348: 600-605.
- LOUIS, P., PINET, V., CAVADORE, P., KERLAN-CANDON, S., CLOT, J. Y ELIAOU, JF. (1994)** Differential expression of HLA-DRB genes according to the polymorphism of their regulatory region, *C R Acad Sci* 317 :161-166
- LOVELAND, B., WANG, C. R., YONEKAWA, H., HERMEL, M Y FISHER LINDAHL, K. (1990).** "Maternally transmitted histocompatibility antigen iof mice: a hydrophobic peptide of a mitochondrially encoded protein" *Cell* 20: 971-980.
- MADDEN, D.R., GORGA, J.C., STROMINGER, J.L. Y WILEY, D.C. (1992).** "The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC". *Cell* 70: 1035-1048.
- MADDEN, D.R., GARBOCZI, D.N. Y WILEY, D.C. (1993).** " The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral presented by HLA-A2". *Cell*. 75: 693-708.
- MADDON, P.J., LITMAN, D.R., GODFREY, M., MADDON, D.E., CHESS, L. Y ALEX, R. (1985).** "The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: A new marker of the immunoglobulin gene superfamily", *Cell*. 42: 93-104.
- MAFFEI, A., PERFETTO, C., OMBRA, N., DEL POZO, G. Y GUARDIOLA, J. (1989).** "Transcriptional and post-transcriptional regulation of human MHC class II genes require the synthesis of short-lived proteins", *J. Immunol.* 142: 3657-3661

- MAKGOBA, M.W., HILDRETH, J.E.K., Y MC. MICHAEL, A.J. (1983). "Identification of a human Ia antigen that is different from HLA-DR and DC antigens", *Immunogenetics* 17: 623-635.
- MALISSEN, M., DAMOTTE, M., BIRNBAUM, D., TRUCY, J. Y JORDAN, B. (1982). "HLA cosmid clones show complete, widely spaced human class I genes with occasional clusters", *Gene* 20: 485-489.
- MALISSEN, M., MALISSEN, B. Y JORDAN, B.R. (1982). "Exon/intron organization and complete nucleotide sequence of an HLA gene", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 893-897.
- MALNATI, M.S., MARTI, M., LAVAUTE, T., JARAQUEMADA, D., BIDDISON, W., DE MARS, R. Y LONG, E.O. (1992). "Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells". *Nature* 357: 702-704.
- MANCA, F., CLARKE, J.A., MILLER, A., SERCARZ, E.E. Y SHASTRI, N. (1984). "A limited region within hen white lysozyme serves as the focus for a diversity of T cell clones", *J. Immunol.* 133: 2075-2078.
- MANIATIS, T., FITSCH, E.F. Y SAMBROOK, J. (1982). en "Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.
- MARRACK, P. Y KAPPLER, F. (1986). *Adv. Immun.* 38: 1-30.
- MARRACK, P. Y KAPPLER, J. (1988). "The T cell repertoire for antigen and MHC", *Immunol. Today* 9: 308-315.
- MARTINEZ, C.K. Y MONACO, J.J. (1991). "Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene". *Nature* 353: 664-667.
- MARTZINGER, P. Y BEVAN, M. J. (1977). "Why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens?", *Cell. Immunol.* 29: 1-5.
- MARYANSKI, J.L. Y BOON, T. (1982). "Immunogenic variants obtained in mutagenesis of mouse mastocytoma P815. IV. Analysis of variant-specific antigens by selection of antigen-loss variants with cytolytic T cell clones". *Eur. J. Immunol.* 12: 406-412.
- MATIS, L.A., CRON, R. Y BLUESTONE, J.A. (1987). "The molecular basis of alloreactivity in antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted T cell clones". *Cell* 51: 59-69.
- MATSUMURA, M., FREMONT, D.H., PETERSON, P.A. Y WILSON, I.A. (1992). "Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules". *Science* 257: 927-934.
- MAURER, D., Y GORSKY, J. (1991). "Transfer of polymorphic monoclonal antibody epitopes to the first and second domains of HLA-DR β chains by site-directed mutagenesis". *J. Immunology*, 146: 621-626.
- McMILLAN, V.M., DENNIS, G.J., GLIMCHER, L.H., FINKELMAN, F.D. Y MOND, J.J.. (1988). "Corticosteroid induction of Ig+Ia-B cells in vitro is mediated via interaction with the glucocorticoid cytoplasmic receptor". *J. Immunology*, 140: 2549-2555.
- MELLINS, E., SMITH, L., ARP, B., COTNER, T., CELIS, E. Y PIOUS, D. (1990). "Defective processing and presentation of exogenous antigens in mutants with normal HLA class II genes", *Nature* 343: 71-74.
- MELLINS, E., KEMPIN, S., SMITH, L., MONJI, T. Y PIOUS, D. (1991). "A gene required for class II-restricted antigen presentation maps to the major histocompatibility complex", *J. Exp. med.* 174: 1607-15.
- MELLOR, A. (1986). "The class I gene family in mice", *Immunol. Today* 7: 19-24.

- MELTON, D.A., KREIG, P.A., REBAGLIATI, M.R., MANIATIS, T., ZINN, K. Y GREEN, M.R. (1984). *Nucleic Acid Res.* 12: 7035.
- MENGLE-GAW, L., Y MC. DEVITT, H.O. (1985). "Genetics and expression of mouse Ia antigens", *Annu. Rev. Immunol.* 3: 367-395.
- MEUER, S.C., SCHLOSSMAN, S.F., Y REINHERZ, E.L. (1982). "Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4 + and T8 + effector T cells recognize products of different major histocompatibility complex regions", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 4395-4399.
- MEUER, S.C., FITZGERALD, K.A., HUSSEY, R.E., HODGDON, J.C., SCHLOSSMAN, S.F. Y REINHERZ, E.L. (1983). "Clonotypic structures involved in antigen specific human T cell function", *J. Exp. Med.* 157: 705-719.
- MILNER, C.M. Y CAMPBELL, R.D. (1990). "Structure and expression of the three MHC-linked HSP 70 genes", *Immunogenetics* 32: 242- 251.
- MIWA, K., DOYLE, C. Y STROMINGER, J.L. (1987). "Sequence-specific interactions of nuclear factors with conserved sequences of human class II major histocompatibility complex genes", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 4939-4943.
- MONACO, J.J. Y McDEVITT, H.O. (1982). "Identification of a fourth class of proteins linked to the murine major histocompatibility complex". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3001-3005.
- MONACO, J.J. Y McDEVITT, H.O. (1986). "The LMP antigens: a stable MHC-controlled multisubunit protein complex". *Hum. Immunol.* 15: 416-426.
- MONACO, J.J., CHO, S. Y ATTAYA, M. (1990). "Transport protein genes in the murine MHC: possible implications for antigen processing", *Science* 250: 1723-1726
- MOMBURG, F., ORTIZ-NAVARRETE, V., NEEFJES, J., GOULMY, E., VAN DE WAL, Y., SPITS, H., POWIS, S.J., BUTCHER, G.W., HOWARD, J.C., WALDEN, P. Y HÄMMERLING, G.J. (1992). "Proteasome subunits encoded in the major histocompatibility complex are not essential for antigen presentation". *Nature* 360: 174-177.
- MOND, J.J., CARMAN, J., SARMA, C., OHARA, J. Y FINKELMAN, F.D.. (1996). "Interferon-gamma suppresses B cell stimulation factor (BSF-1) induction of class II MHC determinants on B cells", *J. Immunol.* 137: 3534-37
- MONROE, J.G. Y CAMBIER, J.C.. (1983). "Level of mla expression on mitogen-stimulated murine B lymphocytes is dependent on position in cell cycle", *J. Immunol.* 130: 626-631
- MONROE, J.G., NIEDEL, J.E. Y CAMBIER, J.C.. (1984). "B cell activation. IV. Induction of cell membrane depolarization and hyper-Ia expression by phorbol diesters suggests a role for protein kinase C in murine B lymphocyte activation", *J. Immunol.* 132: 1472-1478
- MOORE, M. W., CARBONE, F. R. Y BEVAN, M. J. (1988). "Introduction of soluble proteins into the class I pathway of antigen processing and presentation". *Cell* 54: 777-785.
- MORRISON, L.A., LUKACHER, A.E., BRACIALE, V.L., FAN, D.P. Y BRACIALE, T.J. (1986). "Differences in antigen presentation to MHC class I and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones". *J. Exp. Med.* 164: 903-921.
- MOSTOV, K.E., FRIEDLANDER, M. Y BLOBEL, G. (1984). "The receptor for transepithelial transport of Ig A and Ig M contains multiple immunoglobulin-like domains", *Nature* 308: 37-43.
- NABHOLZ, M., CONZELMANN, A., ACUTO, O., NORTH, W., POHLIT, H., VON BOEHMER, H., HENGARTNER, H., MACH, J., ENGERS, H. Y JOHNSON, J. (1980). "Established Murine Cytolytic T-cell lines as tools for a somatic cell genetic analysis of T-cell functions", *Immunological Rev.* 51: 125-156.

- NADLER, L.M., STASHENKO, P., HARDY, R., TOMASELLI, K.J., YUNIS, E.J., SCHLOSSMAN, S.F., Y PESANDO, J.M. (1981).** "Monoclonal antibody identifies a new Ia-like (p 29,34) polymorphic system linked to the HLA-D/DR region", *Nature* 290: 591-593.
- NAKAMURO, K., TANIGAKI, N. Y PRESSMAN, D. (1973).** " Multiple common propierties of human beta 2-microglobulin and the common portion fragment derived from HLA antigen molecules", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 2863-2865.
- NEEFJES, J.J., STOLLORZ, V., PETERS, P.J., GEUZE, M.J. Y PHOEGH, H.L. (1990).** "The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route", *Cell* 61: 171-183.
- NEEFJES, J.J. Y PLOEGH, H.L. (1992).** "Intracellular transport of MHC Class II molecules". *Immunol. Today* 13: 179-183.
- NEEFJES, J.J., MOMBURG, F. Y HÄMMERLING, G.J. (1993).** "Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter". *Science* 261:769-771.
- NEPOM, B.S. (1991).** "The immunogenetics of juvenil rheumatoid arthritis". *Pediatric Rheumatology* 17: 825-842.
- NEPOM, G.T. Y ERLICH, H.A. (1991).** "MHC class II molecules and autoimmunity". *Annu. Rev. Immunol.* 9: 493-525.
- NEPERT, J., NUÑEZ, G., Y STASTNY, P. (1984).** "HLA-A, -B, -C, -DR, -MT, MB, and SB antigens on unstimulated human endothelial cells", *Tissue Antigens* 24: 40-47.
- NISHIMURA, Y., YASUDA, N., SASAZUKI, T., Y SHAW, S. (1984).** "The gene frequency of SB alleles in the Japanese population", *Tissue Antigens* 23: 314-315.
- NOELLE, R.J., KRAMMER, P.H., OHARA, J., UHR, J.W. Y VITETTA, E.S. (1984).** "Increased expression of Ia antigens on resting B cells: An additional role for the B-cell growth factor". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6149-53.
- NOELLE, R.J., KUZIEL, W.A., MALISZEWSKI, C.R., McADAMS, E., VITETTA, E.S. Y TUCKER, P.W.. (1986).** "Regulation of the expression of multiple class II genes in murine B cells by B cells stimulatory factor-1 (BSF-1)". *J. Immunol.* 137: 1718-23.
- NOSE, Y., NAKATSUJI, T., TSUJI, K., Y REINSMOEN, N.L. (1985).** "A new HLA-DP (SB) specificity (Cp63) defined in Japanese and Caucasian cell populations by cloned PLT cells", *13*: 145-149.
- NOVOTNY, J., TONEGAWA, S., SAITO, H., KRANZ, D.M. Y EISEN, H:N: (1986).** "Secondary, tertiary and quaternary structure of T cell specific immunoglobulin-like polypeptide chains". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 742-746.
- NUCHTERN, J.G., BONIFACINO, J.S., BIDDISON, W.E. Y KLAUSNER, R.D. (1989).** "Brefeldin A implicates egress from endoplasmic reticulum in class I restricted antigen presentation", *Nature* 339: 223-226.
- NUCHTERN, J.G., BIDDISON, W.E. Y KLAUSNER, R.D. (1990).** "Class II molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation", *Nature* 343: 74-76.
- OHKUMA, S. Y POOLE, B. (1978).** "Fluorescence probe measurement of the intralysosomal of pH by various agents", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 3327-3331.
- OHTA, N., ANICHINI, A., REINSMOEN, NL., STRASSMANN, G., WERNET, P., Y BACH, F.H. (1985).** "Analysis of human class II antigens by cloned T cell reagents a study using HLA II mutants lymphoblastoid cell lines and monoclonal antibodies detecting the HLA-DP products", *Hum. Immunol* 15: 21-32 (1985).

- OKADA, K., BOSS, J.M., PREHTICE, H., SPIES, T., MENGLER, R., AUFRAY, C., LILLIE, J., GROSSBERGER, D. Y STROMINGER, J.L. (1985). "Gene organization of DC and DX subregions of the human major histocompatibility complex", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 3410-3414.
- OKADA, K., PRENTICE, H.L., BOSS, J.M., LEVY, D.J., KAPPES, D., SPIES, T., RAGHUPATHY, R., MENGLER, R.A., AUFRAY, C., Y STROMINGER, J.L. (1985). "SB subregion of the human major histocompatibility complex: gene organization, allelic polymorphism and expression in transformed cells", *EMBO J.* 3: 2985.
- ONO, S.J., LIOU, H-C., DAVIDON, R., STROMINGER, J.L. Y GLIMCHER, L.H. (1991) Transient expression of antisense hXBP-1 RNA inhibits the transcriptional of a subset of human class II major histocompatibility complex genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 4309-4312.
- ONO, S.J., BAZIL, SUGAWARA, M. Y STROMINGER, J.L. (1991) An isotype-specific *trans*-acting factor is defective in a mutant B cell line that expresses HLA-DQ, but not -DR or -DP, *J Exp Med.* 173:629-637.
- ORR, H.T. Y DE MARS, R. (1983). "Mapping of class I DNA sequences within the human major histomompability complex", *Immunogenetics* 18: 489-502.
- ORR, H.T. (1989). "HLA class I gene family characterization of genes encoding non-HLA -A, -B y -C proteins", In: Dupont, B. *Immunobiology of HLA vol II. Immunogenetics and Histocompatibility*. Springer-Verlag New York, pp. 33-40.
- ORTIZ-NAVARRETE, V., SEELIG, A., GERNOLD, M., FRENTZEL, S., KLOETZEL, P.M. Y HAMMERLING, J. (1991). "Subunit of the 20S proteosome encoded by the major histocompatibility complex". *Nature* 353: 662-664.
- O'SULLIVAN, D.M., NOOMAN, D., Y QUARANTA, V. (1987). "Four Ia invariant chain forms derive from a single gene by alternate splicing and alternate initiation of transcription translation", *J. Exp. Med* 166: 444-460.
- OWEN, M.J., KISSONERGHIS, A. Y LODISH, H.F. (1980). "Biosynthesis of HLA-A and HLA-B antigens in vivo", *J. Biol. Chem.* 255: 9678-9684.
- PARHAM, P. (1990a). "Transporters of delight", *Nature* 348: 674-675.
- PARHAM, P. (1990b). "The peptide feeding and cellular cookery", *Nature* 346: 793-795.
- PARHAM, P. (1991). "Transporters of a peptide pump", *Nature* 351: 271-272.
- PAUL, W.E. (1989). " Major Histocompatibility Complex Antigens and Genes", *Fundamental Immunology*, Second Edition, ed. by William E. Paul, Raven Press Ltd., New York, pgs 491-533.
- PAWELEC, G., SHAW, S., ZIEGLER, A., MULLE, C., Y WERNET, P. (1982). "Differential inhibition of HLA-D or SB-directed secondary lymphoproliferative responses with monoclonal antibodies detecting human Ia-like determinants", *J. Immunol.* 129: 1070-1075.
- PERNIS, B. Y AXEL, R. (1985). "A one and a half receptor model for MHC restricted antigen recognition by T lymphocytes", *Cel. I* 41: 13-16.
- PETERS, P.J., NEEFJES, J.J., OORSCHOT, V., PLOEGH, H.L., GEUZE, H.J. Y (1991). "Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments". *Nature* 349: 669-676.
- PETERSON, M. Y MILLER, J. (1990). "Invariant chain influences the immunological recognition of MHC class II molecules", *Nature* 345: 172-174.

- PIERCE, S.K., MORRIS, J.F., GRUSBY, M.J., KAUYAMA, P., VAN BUSKIRK, A., SRINIVASAN, M., CRUMP, B. Y SMOIENSKI, L. A. (1988). "Antigen presenting function of B Lymphocytes". *Immunol. Rev.* 106: 149-180.
- PISTILLO, M.P., KARR, R.W., KLOHE, E., MAZZOLENI, O. Y FERRARA, G.B. (1992). "Use of transfectants to identify polymorphic epitopes recognized by human monoclonal antibodies". En *HLA 1991*, vol I. Editado por: Tsuji, K., Aizawa, M., Sasazuki, T. Oxford University Press. New York.
- PLOEGH, H.L., ORR, H.T. Y STROMINGER, J.L. (1981). "Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A,B,C) and murine (H-2k, H-2D) class I molecules". *Cell* 24: 287-299.
- POBER, J.S., GUILD, B.C. Y STROMINGER, J.L. (1978). "Phosphorylation" in vivo" and "in vitro" of human histocompatibility antigens HLA-A and -B in the carboxy-terminal intracellular domain". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 6002-6006.
- POBER, J.S., GUILD, B.C., STROMINGER, J.L., VEATCH, W.R. (1981). "Purification of HLA-A2 antigen, fluorescent labeling of its intracellular region, and demonstration of an interaction between fluorescently labeled HLA-A2 antigen and lymphoblastoid cell cytoskeleton proteins in vitro". *Biochemistry* 20: 5625-5633.
- POLJAK, R.J. (1987). Hypothesis: a molecular model for the MHC-restricted recognition of antigens by the T cell receptor. *Ann. Inst. Pasteur* 138: 175-180.
- POLLA, B.S., POLJAK, A., OHARA, J., PAUL, W.E. Y GLIMCHER, L.H.. (1986). "Regulation of class II gene expression: Analysis in B cell stimulatory factor I-inducible murine pre-B cell lines". *J. Immunol.* 137: 3332-3337.
- POLLA, B.S., POLJAK, A., GEIER, S.G., OHARA, J., PAUL, W.E. Y GLIMCHER, L.H.. (1986). "Three distinct signals can induce class II gene expression in a murine pre-B cell line". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 4878-4882.
- POLLA, B.S., OHARA, J., PAUL, W.E., NABAVI, N., MYER, A., LIOU, H-C., SHEN, F-W., GILLIS, S., BONAVENTRE, J.V. Y GLIMCHER, L.H.. (1988). "Differential induction of class II gene expression in murine pre-B cell lines by B cell stimulatory factor-I and by antibodies to B cell surface antigens". *J. Mol. Cell. Immunol.* 3: 363-373.
- POLLACK, M.S. MOSHIEF, R.D. Y MAURER, D.H. (1985). "Evidence for detection of a new allele in the DP (SB) system". *Hum. Immunol.* 12: 103-106.
- PONTAROTTI, P., CHIMINI, G., NGUYEN, C., BORETTO, J. Y JORDAN, B.R. (1989). "Organization of the class I region". In: Dupont B (ed) *Immunobiology of HLA vol II. Immunogenetics and histocompatibility*. Springer-Verlag New York, pp 79-82.
- POWIS, S., TONKS, S., MOCKRIDGE, I., KELLY, A., BODMER, J. Y TROWSDALE, J. (1993). "Alleles and haplotypes of the MHC-encoded ABC transporters TAP1 and TAP2". *Immunogenetics* 37: 373-380.
- RADLEY, E., ALDERTON, R.P., KELLY, A., TROWSDALE, J. Y BECK, S. (1994). "Genomic organization of HLA-DM genes". *J. Biol. Chem.* 269: 18834-18838.
- RASK, L., GUSTAFSSON, K., LARHAMMAR, D., RONNE, H., Y PETERSON, P.A. (1985). "Generation of class II antigen polymorphism". *Immunol. Rev.* 84: 123-143.
- REID, P.A. Y WATTS, C. (1990). "Cycling of cell-surface MHC glycoproteins through primaquine-sensitive intracellular compartments". *Nature* 346: 655-657.
- REITH, W., BARRAS, E., SATOLA, S., KOBR, M., REINHART, D., HERRERO-SANCHEZ, C. Y MACH, B. (1989). "Cloning of the major histocompatibility complex class II promoter binding protein affected in a hereditary defect in class II gene regulation". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4200-4204.

- RIBERDY, J.M., NEWCOMB, J.R., SURMAN, M.J., BARBOSA, J.A. Y CRESSWELL, P. (1992).** "HLA-DR molecules from an antigen processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides". *Nature* 360: 474-477.
- RICHELDI, L., SORRENTINO, R. Y SALTINI, C. (1993).** "HLA-DPB1 glutamate 69: a genetic marker of beryllium disease". *Science* 262: 242-244.
- RIGBY, P.W.J.; DIECKMANN, M.I.; RHODES, C. y BERG, P. (1977).** "Labelling DNA to high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase I". *J. Mol. Biol.* 113: 237-251.
- RODRIGUEZ DE CORDOBA, S., MARSHALL, P. Y RUBINSTEIN, P. (1989).** "Molecular characterization by high resolution isoelectric focusin of the products encoded by the class II region loci of the MHC in humans", *J. Immunol.* 142: 836-841.
- ROBERTSON, M. (1991).** "Proteasomes in the pathway", *Nature* 353: 300-301.
- ROBINS, F.M., HARTZMAN, R.J. Y PHILIPS, E. (1985).** "A new allele of DP: DPw6", *Hum. Immunol.* 12:250.
- ROCHE, P.A. Y CRESSSWELL, P. (1990).** "Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding". *Nature* 345: 615-618.
- ROCHE, P.A., BOWER, R. Y MURPHY, R.F. (1991).** "Formation of a nine subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain". *Nature* 354: 392-394.
- ROEDERER, M., BOWER, R. Y MURPHY, R. F. (1987).** "Kinetics and temperature dependence of exposure of endocytosed material to proteolytic enzymes and loe pH: evidence for a maturation model for the formation of lysosomes", *J. Cell Physiol.* 131: 200-209.
- ROMAGNOLI, P., LAYET, C., YEWEDELL, J., BAKKE, O. Y GERMAIN, R.N. (1993).** "Relationship between invariant chain expression and MHC class II transport into early and late endocytic compartments". *J. Exp. Med.* 177: 583-596.
- ROLLINI, P., MACH, B. Y GORSKY, J. (1985).** "Linkage map of three HLA-DR β chains: evidence for a recent duplication event". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7197-7201.
- ROSA, F.M. Y FELLOUS, M. (1988).** "Regulation of HLA-DR gene by IFN-gamma". *J. Immunol.* 140: 1660-1664.
- ROSENTHAL, A.S., Y SHEVACH, E.M. (1973).** "Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes", *J. Exp. Med.* 138: 1194-1212.
- ROTHBARD, J.B. Y GEFTER, M.L. (1991).** "Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins". *Rev. of Immun.*, 9: 527-565.
- ROTHMAN, J. E. (1989).** "Polipeptide chain binding proteins, catalyts of protein folding and related processes in cells", *Cell* 59: 591-601.
- RÖTZSCHLE, O., FALK, K., DERES, K., SCHILD, H., NORDA, M., METZGER, G. Y RAMMENSEE, H.G. (1990).** "Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells". *Nature* 348: 253-255.
- ROUX-DOSSETO, M., AUFRAY, C., LILLIE, J.W., BOSS, J.M., COHEN, D., DE MARS, R., MAWAS, C., SEIDMAN, J.G., Y STROMINGER, J.L. (1983).** "Genetic mapping of a class II antigen beta-chain cDNA clone to the SB region of the HLA complex" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 6063-6040.
- ROYSTON, I., OMARY, M.B. Y TROWBRIDGE, I.S. (1981).** "Monoclonal antibodies to a human T-cell antigen and Ia-like antigen in the characterization of lymphoid leukemia". *Transplant. Proc.* 8: 761.

- ROZEMULLER, E.H., BOUWENS, A.G., BAST, B.E. Y TILANUS, M.G. (1993).** "Assignment of HLA-DPB alleles by computerized matching based upon sequence data". *Hum. Immunol.* 37: 207-212.
- RUDENSKY, A.Y., PRESTON-HURLBURT, P., HONG, S., BARLOW, A. Y JANEWAY, C. (1991).** "Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules". *Nature* 353: 622-627.
- RUPP, F., ACHA-ORBEA, H., HENGARTNER, H., ZINKERNAGEL, R. Y JOHO, R. (1985).** *Nature* 315: 425-427.
- SADEGH-NASSERI, S., GERMAIN, R.N. (1991).** "A role for peptide in determining MHC class II structure". *Nature* 353: 167-170.
- SAKURAI, M. Y STROMINGER, J.L. (1988).** "B-cell specific enhancer activity of conserved upstream elements of the class II major histocompatibility complex DQB gene". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 6909-6913.
- SALAMERO, J., HUMBERT, M., COSSON, P. Y DAVOUST, J. (1990).** "Mouse B lymphocyte specific endocytosis and recycling of MHC class II molecules". *EMBO J.* 9: 3489-3496.
- SANCHEZ PÉREZ, M., DE MARS, R. Y SHAW, S.** "Mutant B cell lines selected by resistance to lysis by DPw2-specific cytotoxic T cell clones". *Proceedings of the 17th Miami Winter Symposium.*
- SANCHEZ PÉREZ, M. Y SHAW, S. (1986).** "HLA-DP current status", *Human Class II Histocompatibility antigens.* Springer-Verlag. New York. Pag 83.
- SANCHEZ PÉREZ, M., DÍEZ OREJAS, R., PETERSEN, J.W., DE MARS, R. Y SHAW, S. (1990).** "Differences in specificity of "DPw2-specific" cytotoxic T cell clones revealed with HLA-mutant lines: evidence that non-DP HLA genes influence recognition by some clones". *Eur. J. Immunol.* 20: 673-681.
- SANDERSON, F., POWIS, S.H., KELLY, A.P. Y TROWSDALE, J. (1994).** "Limited polymorphism in HLA-DM does not involve the peptide binding groove". *Immunogenetics* 39: 56-58.
- SANGER, F., NICKLEN, S. Y COULSON, A.R. (1977).** "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 74: 5463-5467.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. Y MANIATIS, T. (1974).** "Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- SAPER, M.A., BJORKMAN, P.J. Y WILEY, D.C. (1991).** "Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at a 2.6 Å resolution". *J. Mol. Biol.* 219: 277.
- SARGENT, C.A., DUNHAM, I., TROWSDALE, J. Y CAMPBELL, R.D. (1989).** "Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP 70". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 1968-1972.
- SARTHO, P., JOUVAIN-MARCHE, E., CAZENAVE, P.A. Y LE GUERN, C. (1987).** "Phorbol ester induces class II gene expression in pre-B cell lines". *Eur. J. Immunol.* 17: 1375-1378.
- SCHAFF, W.T., HRUSKA, K.A., McCOURT, D.W., GREEN, M. Y SCHWARTZ, B.D. (1992).** "HLA-DR associates with specific stress proteins and is retained in the endoplasmic reticulum in invariant chain negative cells". *J. Exp. Med.* 176: 657-666.
- SCHENDEL, D.J., HARTZMAN, R., JARAQUEMADA, D., KRISTENSEN, T., MORLING, N., OLLIER, W., TERMIJTELEN, A. Y WANK, R. (1984).** "Segregation analysis of PLT reagents in families. In: Baur MP, Albert ED, Mayr WR (eds) *Histocompatibility testing 1984.* Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, pp 300-301.

- SCHIMID, S. L., FUCHS, R., MALE, P. Y MELLMAN, I. (1988). "Two distinct subpopulations of endosomes involved in membrane recycling and transport to lysosomes", *Cell*. 52: 73-83.
- SCHLESINGER, M. J. (1990). "Heat shock proteins". *J. Biol. Chem.* 265: 1211-1214.
- SCHWARTZ, R.H. (1985). "T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex". *Annu. Rev. Immunol.* 3: 237-261.
- SCOFIELD, V.L., SCHLUMPBERGER, J.M., WEST, L.A. Y WEISSMAN, J.L. (1982). "Protochodate allorecognition is controlled by a MHC- like gene system", *Nature* 295: 449-502.
- SECARZ, E.E., LEHMANN, P.V., AMETANI, A., BENICHO, G., MILLER, A. Y MOUDGIL, K. (1993). "Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants". *Annu. Rev. Immunol.* 11: 729-766.
- SEED, B. (1982). "Attachment of nucleic acids to nitrocellulose and diazonium-substituted supports". *Em Genetic engineering: Principles and methods* (ed. J.K. Setlow and Hollaender), vol4: 91. Plenum Publishing, New York.
- SEGE, K., RASK, L. Y PETERSON, P.A. (1981). "Role of the beta 2- microglobulin in the intracellular processing of HLA antigens", *Biochemistry* 20: 4523-4530.
- SEKALY, R. P., JACOBSON, S., RICHERT, J. R., TONELLE, C., MC FARLAND, H. Y LONG, E. O. (1988). "Antigen presentation to HLA-class II restricted measles virus specific T-cell clones can occur in the absence of the invariant chain", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 1209-1212.
- SEKI, B., SPURR, N., OBATA, F., GOYERT, S., GOODFELLOW, P. Y SILVER, J. (1985). "The human Thy-1 gene: structure and chromosomal location", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 6657-6661.
- SERVENIUS, B., GUSTAFSSON, K., WIDMAR, E., EMMOTH, E., ANDERSSON, G., LARHAMMER, D., RASK, L., Y PETERSON, P.A. (1985). "Molecular map of the human HLA-SB region", *EMBO J.* 3: 3209.
- SERVENIUS, B., RASK, L., Y PETERSON, P.A. (1987). "Class II genes of the human major histocompatibility complex. The DO beta gene is a divergent member of the class II beta gene family", *J. Biol. Chem.* 262: 8759-8766.
- SEVERINSSON, L. Y PETERSON, P.A. (1984). "Beta 2-microglobulin induces intracellular transport of human class I transplantation antigen heavy chains in *Xenopus laevis* oocytes", *J. Cell. Biol.* 99: 226-232.
- SETTE, A., CEMAN, S., KUBO, R.T., ET AL. (1992). "Invariant chain peptides in most HLA-DR molecules of an antigen-processing mutant". *Science* 258: 1801-1804.
- SHAW, S., POLLACK, M.S., PAYNE, S.M. Y JOHNSON, A.H. (1980). "HLA-linked B cell alloantigens of a new segregant series: population studies of the SB antigens", *Hum. Immunol.* 1: 177-185.
- SHAW, S., DUQUESNOY, R.J. Y SMITH, P.L. (1981). "Population studies of the HLA-linked SB antigens", *Immunogenetics* 14: 153-162.
- SHAW, S., DE MARS, R., SCHLOSSMAN, S.F., SMITH, P.L., LAMPSON, L.A., Y NADLER, L.M. (1982). "Serologic identification of the human secondary B cell (SB) antigens: correlations between function, genetics, and stucture", *J. Exp. Med.* 156: 731-741.
- SHAW, S., SANCHEZ-PEREZ, M., Y DE MARS, R. (1984). "Analysis of DP region products by T cells and monoclonal antibodies: Blocking 45 DP-specific proliferation and cell-mediated

- cytotoxicity", In: Baur, M.P., Albert, E.D., Mayr, W.R. (eds) *Histocompatibility testing*. Springer, Berlin. Heidelberg. New York Tokyo pp 465-468.
- SHAW, S., ZIEGLER, A., Y DE MARS, R. (1985).** "Specificity of monoclonal antibodies directed against human and murine class II histocompatibility antigens as analyzed by binding to HLA-deletion mutant cell lines", *Hum. Immunol.* 12: 191-212.
- SHEPHERD, J.C., SCHUMACHER, T.N.M., ASHTON-RICKARDT, P.G., IMAEDA, S., PLOEGH, H.L., JANEWAY, C.A. Y TONEGAWA, S. (1993).** "TAP-1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective". *Cell* 74: 577-584.
- SHERMAN, P.A., BASTA, P.V. Y TING, J. P-Y. (1987).** "Upstream DNA sequences required for tissue-specific expression of the HLA-DRA gene", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 4254-4258.
- SHERMAN, P.A., BASTA, P.V., MOORE, T.L., BROWN, A.M. Y TING, J. P-Y. (1989a).** "Class II box consensus sequences in the HLA-DRA gene: transcriptional function and interaction with nuclear proteins", *Mol. Cell. Biol.* 9: 50-56.
- SHERMAN, P.A., BASTA, P.V., HEGUY, A., WLOCH, M.K., ROEDER, R.G. Y TING, J. P-Y. (1989b).** "The octamer motifs is a B-lymphocyte-specific regulatory element of the HLA-DRA gene promoter", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 6739-6743.
- SHIMIZU, Y., GERAGTY, D.E., KOLLER, B.H., ORR, H.T. Y DE MARS, R. (1988).** "Transfer and expression of three cloned human non HLA -A, -B y -C, class I major histocompatibility complex genes in mutant lymphoblastoid cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 227-231.
- SLOAN, J.H. Y BOSS, J.M. (1988).** "Conserved upstream sequences of human class II major histocompatibility genes enhance expression of class II genes in wild-type but not mutant B-cell lines", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 8186-8190.
- SNIDER, M.D. Y ROGERS, O.C. (1985).** "Intracellular movement of cell surface receptors after endocytosis: resialylation of asialo-transferrin receptor in human erytroleukemia cells". *J. Cell Biol.* 100: 826-834.
- SOLLID, L.M., MARKUSSEN, G., EK, J., GJERDE, H., VARTDAL, F. Y THORSBY, E. (1989).** "Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha / beta heterodimer". *J. Exp. Med.* 169: 345-350.
- SONG, Z., KRISHNA, S., THANOS, D., STROMINGER, J.L. Y ONO, S.J. (1994)** A novel cysteine-rich sequence-specific DNA-binding protein interacts with the conserved X-box motif of the human major histocompatibility complex class II via a repeated Cys-His domain and functions as a transcriptional repressor, *J Exp Med* 180: 1763-1774.
- SPIES, T., BRESNAHAN, M. Y STROMINGER, J.L. (1989).** "Human major histocompatibility complex contains a minimum of 19 genes between the complement cluster and HLA-B", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 8955-8958.
- SPIES, T., BRESNAHAN, M., BAHRAM, S., ARNOLD, D., BLANCK, G., MELLINS, E., PIOUS, D. Y DE MARS, R. (1990).** "A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway", *Nature* 348: 744-747.
- SPIES, T. Y DE MARS, R. (1991).** "Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter", *Nature* 351: 323-324.
- STAERZ, U.D., KARASUYAMA, H. Y GARNER, A.M. (1987).** "Cytotoxic T lymphocytes against a soluble protein", *Nature* 342: 449-451.
- STEEL, C.M. (1984).** "Disease markers. Human MHC Class II antigens: genetics, structure and

- STEINMAN, R. M., HELLMAN, I. S., MULLER, W. A., Y COHN, Z. A. (1983). "Endocytosis and the recycling of plasma membrane", *J. Cell Biol.* 95: 1-127.
- STEINMETZ, M., Y HOOD, L. (1983). "Genes of the major histocompatibility complex in mouse and man", *Science* 222: 727-733.
- STERN, L.J. Y WILEY, D.C. (1992). "The human class II MHC protein HLA-DR1 assembles as empty alfa/beta heterodimers in the absence of antigenic peptide". *Cell* 68: 465-477.
- STERN, L.J., BROWN, J.H., JARDETZKY, T.H., GORGA, J.C., URBAN, R.G., STROMINGER, J.L., Y WILEY, D.C. (1994). "Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide". *Nature* 368: 215-221.
- STIMAC, E., URIELI-SHOVAL, S., KEMPIN, S. Y PIOUS, D. (1991) Defective HLA DRA X box mutants in the class II transactive transcription factor mutant 6.1.6 and in cell lines from class II immunodeficient patients. *J Immunol* 146: 4398-4405.
- STOCKINGER, B., PESSARA, U., LIN, R.H., HOBICHT, J. Y GREZ, M. (1989). "A role of Ia-associated invariant chains in antigen processing and presentation". *Cell* 56: 683-689.
- STRACHANM T. (1987). "Molecular genetics and polymorphism of class I HLA antigens". *Br. Med. Bull.* 43: 1-14.
- STRUBIN, M., BERTE, C., Y MACH, B. (1986). "Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen associated invariant chain", *EMBO J.* 5: 3483-3488.
- STUART, P.M., ZLOTNIK, A. Y WOODWARD, J.G. (1988). "Induction of class I and class II MHC antigen expression on murine bone marrow-derived macrophages by IL-4", *J. Immunol.* 140: 1542-1547.
- SUGDEN, B., MARSH, K. Y YATES, J. (1985). "A vector that replicates as a plasmid and can be efficiently selected in B-lymphoblasts transformed by Epstein-Barr Virus", *Mol. and Cel. Biol.* 5: 410-413.
- SUTCLIFFE, J.G., MILNER, R.J., SHINNICK, T.M. Y BLOOM, F.E. (1983). "Identifying the protein products of brain-specific genes with antibodies to chemically synthesized peptides", *Cell.* 33: 671-682.
- SWEESTER, M. T., MORRISON, L. A., BRACIALE, V. L. Y BRACIALE, T. J. (1989). "Recognition of pre-processed endogenous antigen by class I but not class II MHC-restricted T cells". *Nature* 342: 180-182.
- TAKAHASI, H., D TAKESHITA, T., MOREIN, B., PUTNEY, S., GERMAIN, R.N., Y BERZOFKY, J.A. (1990). "Induction of CD8+ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs", *Nature* 344: 873-875.
- TERMIJTELEN, A., BRADLEY, B.A., Y VAN ROOD, JJ. (1980). "A new determinant, defined by PLT, coded for in the HLA region and apparently independent of the HLA-D and DR loci", *Tissue Antigens* 15: 267-274.
- TERMIJTELEN, A., VAN ROOD, JJ. (1981). "The role in primary MHC of the non HLA-D/DR determinant PL 3 A", *Tissue Antigens* 17: 57-63.
- TERMIJTELEN, A., SHAW, S., Y VAN ROOD, J.J. (1983). "Identity of PL 3 A and SB 1", *Tissue Antigens* 21: 400-401.
- TEYTON, L., O'SULLIVAN, D. Y DICKINSON, P.W. (1990). "Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways". *Nature* 348: 39-44.

- THYZZER, E.E. (1909). "A study of interitance in mice reference to their susceptibility to transplantable tumors", *J. Med. Res.* 21: 519-573.
- TOMELLE, C., DE MARS, R. Y LONG, E.O. (1985). "DO beta: A new beta chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression", *EMBO J.* 4: 2839-2847.
- TONEGAWA, S. (1983). "Somatic generation of antibody diversity", *Nature* 302: 575-581.
- TOWNSEND, A., BASTIN, J., GOULD, K. Y BROWNEE, G.G. (1986). "Cytotoxic T lymphocytes recognize influence haemagglutinin that lacks a signal sequence", *Nature* 324: 575-577.
- TOWNSEND, A. Y BODMER, H. (1989). "Antigen recognition by class I restricted T lymphocytes", *Ann. Rev. Immunol.* 7: 601-624.
- TOWNSEND, A., OHLEN, C., BASTIN, J., LJUNGGREN, H.G., FOSTER, L. Y KÄRRE, K. (1989). "Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides", *Nature* 340: 443-448.
- TRAGARD, L., CURMAN, B., WIMAN, K., RASK, L. Y PETERSON, P.A. (1979). "Chemical, physical-chemical and immunological properties of papain solubilized human transplantation antigens", *Biochemistry* 18: 2218-2225.
- TROWSDALE, J., YOUNG, J.A.T., KELLY, A.P., AUSTIN, P.J., CARSON, S., MEUNIER, H.S.A., EHRLICH, H.A., SPIELMAN, R.S., BODMER, J. Y BODMER, W.F. (1985). "Structure, sequence and polymorphism in the HLA-D region", *Immunol. Rev.* 85: 1-44.
- TROWSDALE, J., Y KELLY, A. (1985). "The human HLA class II alfa chain gene DN alfa is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions", *EMBO J.* 4: 2231-2237.
- TROWSDALE, J., HANSON, I., MOCKRIDGE, I., BECK, S., TOWNSEND, A. Y KELLY, A. (1990). "Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters", *Nature* 348: 741-744.
- TROWSDALE, J., RAGOISSIS, J. Y DUNCAN CAMPBELL, R. (1991). "Map of the human MHC". *Immunol. Today* 12: 443-446.
- TSANG, S.Y. NAKANISHI, M. Y PETERLIN, B.N. (1988). "B-cell-specific and interferon-gamma inducible regulation of the HLA-DRA gene", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 8598-8602.
- TSANG, S.Y. NAKANISHI, M. Y PETERLIN, B.N. (1990). "Mutational analysis of the DRA promoter: cis-acting sequences and trans-acting factors", *Mol. Cell. Biol.* 10: 711-719.
- TURKEWITZ, A.P., SULLIVAN, C.P. Y MESCHER, M.F. (1983). "Large-scale purification of murine I-Ak and I-Ek antigens and characterization of the purified proteins", *Mol. Immunol.* 20: 1139-1147.
- UNANUE, E. R. (1984). "Antigen presenting function of the macrophage". *Ann. Rev. Immun.* 2: 395-428.
- UNANUE, E.R. Y ALLEN, P.M. (1987). "The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells". *Science* 263: 551-557.
- VAN BLEEKE, G.M. Y NATHANSON, S.G. (1990). "Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2K^b". *Nature* 348: 213-216.
- VAN BUSKIRK, A., CRUMP, B. L., MARGOLIASH, E. PIERCE, S. K. (1989). "A peptide binding protein having a role in antigen presentation is a member of the HSP70 heat shock family", *J. Exp. Med.* 170: 1799-1809.

- VAN LEEUWEN, A., TERMIJTELEN, A., SHAW, S., Y VAN ROOD, J.J. (1982). "The recognition of a polymorphic monocyte antigen in HLA", *Nature* 298: 565-567.
- VANDERIJN, M., BERNABEU, C., ROYER-POKORA, B., WEISS, J., SEIDMAN, J.G., DEVRIES, J., SPITS, H. Y TERHOST, C. (1984). "Recognition of HLA-A2 by cytotoxic T lymphocytes after DNA transfer into human and murine cells", *Science* 226: 1083-1085.
- VAN HUIJSDUIJNEN, R.H., LI, X.Y., BLACK, D., MATTHES, H., BENOIST, C. Y MATHIS, D. (1990). "Co-evolution from yeast to mouse: cDNA cloning of the two NF-Y (CP-1/CBF) subunits", *EMBO J.* 9: 3119-3127.
- VENKITARAMAN, A.R.; CULBERT, E.J. Y FELDMAN, M. (1987). "A phenotypically dominant regulatory mechanism supresses major histocompatibility complex class II gene expression in a murine plasmacytoma". *Eur. J. Immunol.* 17: 1441-46.
- VIEIRA, J. y MESSING, J. (1982). "The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers". *Gene* 19: 259-268.
- VIVILLE, S., NEEFJES, J., LOTTEAU, V., DIERICH, A., LEMEUR, M., PLOEGH, H., BENOIST, C. Y MATHIS, D. (1993). "Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain". *Cell* 72: 635-648.
- WADE, W.F., DAVOUST, J., SALAMERO, J., ANDRÉ, P., WATTS, T.H., CAMBIER, J.C., (1993). "Structural compartmentalization of MHC class II signaling function". *Immunol Today* 14: 539-546.
- WALLNY, H. J. Y RAMMENSE, H. G. (1990). "Identification of classical minor histocompatibility antigen as cell-derived peptide", *Nature* 343: 275-278.
- WARE, C.F., KRANGEL, M.S., PIOUS, D., BUKAROFF, S.J. Y STROMINGER, J.L. (1983). "Recognition of HLA-A2 mutant and variant target cells by an HLA-A2 allospecific human cytotoxic T lymphocyte line". *J. Immunol.* 131: 1312-1317.
- WATSON, A.J., DE MARS, R., TROWDRIGE, I.S., Y BACH, F.H. (1983). "Detection of a novel human class II HLA antigen", *Nature* 304: 358-361.
- WEI, X. Y ORR, H.T. (1990). "Differential expression of HLA-E, HLA-F and HLA-G transcripts in human tissue". *Hum. Immunol.* 29: 131.
- WEISS, S. Y BOGEN, B. (1991). "MHC class II-restricted presentation of intracellular antigen", *Cell* 64: 767-776 (1991).
- WERDELIN, O. (1987). "T cells recognize antigen alone and not MHC molecules", *Immunol. Today* 8: 80-84.
- WILEY, H. S. VAN NOSTRAND, W., MCKINLEY, D. N. Y CUNNINGHAM, D. D. (1985). "Intracellular processing of epidermal growth factor and its effect on ligand-receptor interactions", *J. Biol. Chem.* 260: 5290-5295.
- WILLIAM, R., HEATH, M., HURD, E., CARBONE, F.R. Y SHERMAN, L.A. (1989). "Peptide-dependent recognition of H-2K^b by alloreactive cytotoxic T lymphocytes". *Nature* 341: 749.
- WILLIAMS, D.B., BARBER, B.H., FLAVELL, R.A. Y ALLEN, H. (1989). "Role of beta 2-microglobulin in the intracellular transport and surface expression of murine class I histocompatibility molecules". *J. Immunol.* 142: 2796-2806.
- WILSON, R.K., LAI, E., CONCANNON, P., BARTH, R.K. Y HOOD, L.E. (1988). "Structure, organization and polymorphism of murine and human T-cell receptor alpha and beta chain gene families" *Immunol. Rev.* 101: 149-1721.

- WINCHESTER, G., SUNSHINE, G. H., NARDI, N. Y MITCHISON, N. A. (1984). "Antigen presenting cells do not discriminate between self and nonself", *Immunogenetics* 19:487-491.
- WINTER, E., YAMAMOTO, F., ALMOGUERA, C. Y PERUCHO, M. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 7575.
- WORTZEL, R.D., URBAN, J.L., PHILIPS, C., FITCH, F.W. Y SCHREIBER, H. (1983). "Independent immunodominant and immunorecessive tumor-specific antigens on a malignant tumor: antigenic dissection with cytolytic T cell clones". *J. Immunol.* 130: 2461-2465.
- YAMASHIRO, D. J. Y MAXFIELD, F. R. (1987). "Acidification of morphologically distinct endosomes in mutant and wild type Chinese hamster ovary cells", *J. Cell Biol.* 105: 2723-33.
- YANG, Z., SUGAWARA, M., PONATH, P.D., WESSENDORF, L., BANERJI, J., LI, Y. Y STROMINGER, J.L. (1990). "Interferon gamma response region in the promoter of the human DPA gene", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87: 9226-9230.
- YEWEDELL, J.W., BENNINK, J.R. Y HOSAKA, Y. (1988). "Cells process exogenous proteins for recognition by cytotoxic T lymphocytes". *Science* 239: 637-640.
- YEWEDELL, J.W. Y BENNICK, J.R. (1989). "Brefeldin A Specifically inhibits presentation of protein antigens to cytotoxic T lymphocytes", *Science* 244: 1072-1075.
- YOUNG, J.A. Y TROWSDALE, J. (1985). "A processed pseudogene in an intron of the HLA-DP β chain gene is a member of the class II β gene family", *Nucleic Acids. Res.* 13: 8883-8891.
- YOUNG, A.C.M., ZHANG, W., SACCHETTINI, J.C. Y NATHENSON, S.G. (1994). "The three-dimensional structure of H-2Db at 2.4 Å resolution: implications for antigen-determinant selection". *Cell* 76: 39-50.
- ZAMOYSKA, R. Y PARNES, J.R. (1988). "Rescue of Daudi cell expression by transfection of the mouse beta 2-microglobulin gene". *J. Exp. Med.* 167: 288-299.
- ZEIGLER, H.J. Y UNANUE, E.R.(1981)."Identification of a macrophage antigen-processing event required for I-region-restricted antigen presentation to lymphocytes". *J. Immunol.* 2: 64-70.
- ZELEZNIK-LE, N.J., AZIZKLAN, J.C. TING, J. P-Y. (1991). "Affinity-purified CCAAT-box-binding protein (YEBP) functionally regulates expression of a human class II major histocompatibility complex gene and the herpes simplex virus thymidine kinase gene", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1873-1877.
- ZHANG, W., YOUNG, A.C.M., IMARAI, M., NATHENSON, S.G. Y SACCHETTINI, J.C. (1992). "Crystal structure of the major histocompatibility complex class I H-2K^b molecule containing a single viral peptide: implications for peptide binding and T-cell receptor recognition". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8403-8407.
- ZIEGLER, A., BLOEMER, K., POHLA, H., WEISS, E., SCHNEIDER, P Y RAGOUSSIS, J. (1989). "Towards a Physical Map of the HLA Complex", En. Duport, B., (ed) *Immunobiology of HLA* vol II. Immunogenetics and Histocompatibility. Springer-Verlag New York pp 75-78.
- ZIJLSTRA, M., BIX, M., SIMISTER, N.E., LORING, J.M., RAULET, D.H. Y JAENISCH, R. (1990). "Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8⁺ cytolytic T cells". *Nature* 344: 742-746.